

Klinik für Kleintiermedizin
der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
Direktorin: Prof. Dr. med. vet. Claudia Reusch

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Prof. Dr. med. vet. Claude Favrot

**Untersuchung von regulatorischen T-Zellen
bei gesunden Hunden und Katzen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Patrick Hügli

Tierarzt

von Meikirch, Bern, Schweiz

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Claude Favrot, Hauptreferent

Prof. Dr. med. vet. Regina Hofmann-Lehmann, Korreferentin

2016

Klinik für Kleintiermedizin
der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
Direktorin: Prof. Dr. med. vet. Claudia Reusch

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Prof. Dr. med. vet. Claude Favrot

**Untersuchung von regulatorischen T-Zellen
bei gesunden Hunden und Katzen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Patrick Hügli

Tierarzt

von Meikirch, Bern, Schweiz

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Claude Favrot, Hauptreferent

Prof. Dr. med. vet. Regina Hofmann-Lehmann, Korreferentin

2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung (Deutsch)	5
Zusammenfassung (Englisch)	6
Einleitung	7
<i>Anfänge der Immunregulation</i>	7
<i>Kategorisierung von Treg</i>	8
nTreg.....	8
a/i Treg.....	9
<i>Von CD4⁺ über CD25⁺ zu FoxP3</i>	11
CD4 ⁺ Zellen die autoimmune suppressive Aktivität aufweisen.....	11
Natürlich entstehende CD25 ⁺ CD4 ⁺ T-regulatorische Zellen und deren Rolle in Eigentoleranz.....	12
Die Entdeckung von FoxP3.....	13
FoxP3 bei Hunden.....	14
FoxP3 bei Katzen.....	14
Ziel der Studie.....	14
Material und Methoden	15
<i>Hunde und Katzen</i>	15
Einschlusskriterien.....	15
Tierversuchsbewilligung.....	15
Blutentnahme und Aufbewahrung der Proben.....	15

PBMC Isolation durch Dichtegradient-Zentrifugation	16
Zellkultur und Stimulation.....	17
Markierung der PBMC mittels Antikörper.....	18
Messung der markierten PBMCs	20
Analyse der Daten	25
Resultate.....	26
<i>Hunde</i>	26
Resultate für Tregs von gesunden Hunden	27
Stimulation von PBMCs beim Hund	31
<i>Katzen</i>	33
Resultate von Messwerten für Tregs von gesunden Katzen	33
Stimulation von PBMCs bei der Katze	37
<i>Vergleich der Werte von Hunden und Katzen</i>	38
Diskussion.....	40
<i>Untersuchungen an gesunden Hunden</i>	40
Resultate gesunde Hunde	40
Stimulation der Tregs bei gesunden Hunden.....	41
<i>Untersuchungen an gesunden Katzen</i>	42
Resultate Katzen.....	42
Normalwerte CD4 ⁺ bei der Katze	43
Stimulation der nTregs bei gesunden Katzen	43
Vergleich der Tregs bei Hunden und Katzen	44

<i>Schlussfolgerung</i>	44
Referenzen	45
Anhang	51

Zusammenfassung (Deutsch)

Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich 2014

Patrick Hügli

Dermatologie, Klinik für Kleintiermedizin

E-Mail: dekanat@vetadm.uzh.ch

Untersuchung von regulatorischen T-Zellen bei gesunden Hunden und Katzen

T regulatorische Zellen (Treg) spielen eine wichtige Rolle in der Modulation des Immunsystems. Durch deren Fehlen oder erhöhte Expression kann es zu verschiedenen pathologischen Prozessen wie Allergien, Autoimmunerkrankungen oder chronischen Infektionen kommen. Es gibt Hinweise, dass Tiere mit Allergien erhöhte Werte an Tregs aufweisen. Das Ziel dieser Studie ist es, die Methodik zur Detektion von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen via Flowzytometrie zu etablieren und damit Tregs bei gesunden Katzen und Hunden zu quantifizieren und zu vergleichen, sowie den Einfluss einer mitogenen Stimulation auf den Prozentsatz der Treg bei Hund und Katze zu bestimmen.

Es konnte *in vitro* eine signifikante Stimulation von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen bei Hunden und Katzen gezeigt werden. Hunde wiesen *in vivo* signifikant höhere $CD4^+FoxP3^+$ Zellen als Katzen auf. Bei Katzen lag der Median bei 0.13%, bei Hunden bei 1.59%. Katzen haben signifikant tiefere Werte an Tregs als Hunde, was darin begründet sein kann, dass sie einen anderen Pathomechanismus auf die Antwort auf Allergene aufweisen als Hunde.

$CD4^+CD25^+FoxP3^+$ -Zellen, Treg, Hunde, Katzen

Zusammenfassung (Englisch)

Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich 2014

Patrick Hügli

Dermatology, Clinic for Small animal medicin

E-Mail: dekanat@vetadm.uzh.ch

Investigation of regulatory T-cells in healthy dogs and cats

T regulatory cells (nTreg) play an important role in the modulation of the immune system. By the lacking or hightend expression of tregs different pathomechanisms can arise such as allergies, autoimmune diseases or chronic infections. There are indications, that animals with elevated values of tregs exhibit allergies. The goal of this study was to establish a method for CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ detection via flowcytometry and by this to quantify and compare tregs in healthy dogs and cats, as well as to study the influence of mitogens on the expression of tregs in cats and dogs.

We were able to show a significant stimulation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-cells. Dogs showed significantly higher values as cats. In cats the median for CD4⁺FoxP3⁺ -cells was at 0.13% and for dogs it was at 1.59%. Cats show significantly lower treg values than dogs, the reason be a different Pathomechanism in answering to allergies.

CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺-Cells, Treg, Dogs, Cats

Einleitung

Anfänge der Immunregulation

Die ersten Berichte über eine Regulation des Immunsystems gehen auf das Jahr 1905 zurück. Paul Ehrlich und J. Morgenroth berichteten, dass eine Immunisierung gegen eigenes Gewebe nicht möglich ist ¹. Einige Jahrzehnte später entdeckten R.E. Billingham et al. die Basis der immunologischen Toleranz und der Immunregulation ². Sie benutzten die Haut von Mäusen als Tiermodell. Daran zeigten sie, dass Mäuse, die in der Gebärmutter (*in utero*) mit Gewebetransplantaten eines Individuums von der selben Spezies (Allografts) immunisiert wurden, im späteren Leben Hauttransplantate von anderen Mäusen (allogenen Mäusen) übernehmen konnten ³. Heute weiss man, dass es viele Mechanismen zur Errichtung einer immunologischen Toleranz gegen das Selbst und der Immunhomeostase gibt. Zu diesen Mechanismen zählt die T-Zell mediierte Unterdrückung einer immunologischen Antwort gegenüber dem Selbst und Nicht-Selbst. Diese Regulation des Immunsystems durch T-Zellen hat in den letzten Jahren enorm an Interesse gewonnen ⁴. Schon 1970 haben Greshon und Kondo bei Ihren Untersuchungen T-Zellen gefunden, die nicht nur die Immunantwort steigern, sondern auch solche, welche die Immunantwort dämpfen ⁵. Diese Dämpfung der Immunantwort wurde von einer T-Zell Population mediiert, die sich von T-Helferzellen unterscheiden. Diese Zellpopulation wurde damals unter dem Begriff „Suppressor Zellen“ bekannt ⁵. 1980 und 1990 nahm man Abstand vom Begriff der „suppressiven Zellen“ ⁶. Es gibt einige Gründe dafür, weshalb der Begriff „Suppressor Zellen“ verworfen wurde und das Interesse an dieser Zellpopulation verschwand. Bei der Untersuchung eines Gens der Maus, von welchem man dachte, dass es für die Expression des MHC (major histocompatibility complex) zuständig sei, konnte die sogenannte I-J Sequenz nicht gefunden werden. Diese Sequenz sollte für die Codierung eines Moleküls zuständig sein, welches für suppressive Funktionen verantwortlich ist ⁷. Zum anderen fehlten eindeutige Marker um „Suppressor Zellen“ von anderen T-Zellen zu unterscheiden. Es bestanden auch Unklarheiten in der molekularen Funktionsweise der Suppression ⁶.

In den folgenden Jahren wurden weitere Experimente über die Immunregulation durchgeführt. Um den Begriff der „Suppressor Zellen“ aus dem Wege zu gehen, hat sich der Begriff regulatorischen T-Zellen (Treg) etabliert ⁸. Viele dieser *in vivo* Studien wurden an Mäusen mit verminderten Lymphozytenzahlen (lymphopenischen Mäusen) oder an Mäusen mit verringertem T-Zell Repertoire durchgeführt ⁹⁻¹¹.

Bei diesen lymphopenischen Mäusen oder Mäusen mit verringertem T-Zell Repertoire konnte eine Immunität gegen das Selbst (Autoimmunität) induziert werden ⁹.

Allerdings konnte bei Mäusen mit intakter Immunhomeostase die Autoimmunität nur in einem Fall reproduziert werden ^{12,13}.

Mit der Entdeckung, der Expressierung des Transkriptionsfaktor FoxP3 durch Tregs, kam eine neue Dimension in die Thematik der Immunregulation ¹⁴. Es scheint, dass bei Mäusen FoxP3 nur durch Tregs exprimiert wird. Bei Menschen gibt es Hinweise, dass FoxP3 nicht nur von einer Untergruppe (Subpopulation) von T-Zellen exprimiert wird ¹⁵. Mäuse wie auch Menschen mit einem defektivem FoxP3/FoxP3 Gen leiden an autoimmunen Erkrankungen ^{16,17}.

Kategorisierung von Treg

Jede T-Zelle mit der Fähigkeit eine Immunantwort zu unterdrücken wird als regulatorische T-Zelle (Treg) angesehen. Diese Zellen können grob in natürliche Treg (nTreg) und adaptive oder induzierte Treg (aTreg oder iTreg) kategorisiert werden.

nTreg

Zu den nTreg gehören CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺- und NKT-Zellen (natürliche Killer T-Zellen).

CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen können weiter durch die Expression des CD62 Liganden, CD103, glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR), zytotoxisches T-lymphozyten Antigen 4 (CTLA-4), CD152, Neutrophilin und CD45RO charakterisiert werden ^{18,19}.

NKT Zellen sind eine spezielle Population von T-Zellen, welche alpha/beta TCR (T-Zell-Rezeptoren) exprimieren. NKT Zellen erkennen spezifisch Glycolipide, welche mit Glycolipid A Galactosylceramid verwandt sind. Diese kommen oft bei pathogenen Mikroorganismen und Tumorzellen vor. NKT sekretieren Interleukin (IL)-4, IL-10, Interferon (INF)-gamma und Transforming Growth Factor (TGF)-beta. Durch diese Zytokine beeinflussen sie eine Reihe von autoimmunen Erkrankungen am Tiermodell^{20,21}.

a/i Treg

Adaptive oder induzierte Treg entstehen durch die Aktivierung von muren (ausgereiften) T-Zellen in Abwesenheit einer optimalen Antigen Exposition oder Kostimulation oder bei Anwesenheit von gewissen inhibitorischen Zytokinen¹. Zu den iTreg werden die Typ 1 regulatorischen Zellen (Tr1) und die Th3 Zellen gezählt.

Tr1 Zellen haben sowohl T-Helfer 1 (Th1) und Th2 phenotypische Marker (Chemokin-Rezeptoren) wie CXCR3, CCR3, CCR4, CCR5 und CCR8. Bei Aktivierung exprimieren sie CD40L, CD69, CD28, CTLA-4, IL2R-alpha, IL15R-alpha und Human leucocyte antigen-DR(Allel des Gens) (HLA-DR). Tr1 Zellen sind charakterisiert durch ihre erhöhte Produktion von IL-10, TGF-beta und IL-5¹. Naive CD4⁺T-Zellen konvertieren unter dem Einfluss von immunsuppressiven Medikamenten, löslichen Proteinen, chronischer Stimulation mit Allergenen, infektiös oder Tumor Antigen in IL-10 produzierende Tr1 Zellen^{22,23}. Diese Zellen führen zur Entwicklung einer heterologen Art der Suppression für nicht spezifische Antigene durch die Sekretion von IL-10 oder anderen Mediatoren wie CTLA-4, TGF-beta, GITR oder Programmed cell death Protein (PD)-1²⁴.

Th3 Zellen werden induziert über orale Antigenaufnahme und führen ihre suppressive Wirkung über die Expression von TGF-beta aus²⁵.

Tabelle 1: Eigenschaften von Tregs

Eigenschaften	nTreg CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	n Treg NKT	iTreg Tr1	iTreg Th3
Entstehung	Thymus	Thymus	Peripherie (MALT)	Peripherie (MALT)
Phenotype	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	NKT	CD4 ⁺ CD25 ⁻	CD4 ⁺ CD25 ⁺ von CD25 ⁻ precursors
Charakterisierung	CTLA 4 ⁺ GITR ⁺ CD45RO ⁺ , CD62 ⁺ , CD103 ⁺ , CD152 ⁺ , Neutrophilin ⁺	α/β-T-Zell-Rezeptor (TCR) NK1.1 ⁺ und NK1.1 ⁻ , CD16 ⁺ , CD56 ⁺	CD45RB ^{low} Foxp3 ⁻	CD25 ^{low} -variable CD45RB ^{low} Foxp3 ⁺
Suppression	Kontakt, Granzym-B abhängig, TGF- β	Perforin Granzym	IL-10 mediert	TGF-β mediert
Target Cells	APC und Effector T Cells	CD1b Zellen	Effector T Cells	unbekannt
<i>in vivo</i> Funktion	Suppression von autoreaktiven T-Zellen	Modulation der Th1/Th2 Balance	Orale Immunität, Entzündungsreaktion	Orale Immunität, Entzündungsreaktion
<i>in vitro</i> Expansion	TCR/CD28 Stimulation und IL-2		CD3, IL-10, Retinolsäure	CD3, TGF-β

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue; APC: antigen presenting cell

Von CD4⁺ über CD25⁺ zu FoxP3

CD4⁺ Zellen die autoimmune suppressive Aktivität aufweisen

1969 konnten Nishizuka und Sakakura zeigen, dass eine Thymektomie (Entfernung des Thymus) bei weiblichen Mäusen zwischen dem zweiten und dem vierten Tag nach der Geburt (*post partum*) zu einer Zerstörung der Eierstöcke führt³. Sie vermuteten den Grund der zerstörten Ovarien darin, dass der Thymus ein sogenanntes „ovary-tropic Hormon“ sezerniert. Bei thymektomierten Tieren sollte dieses Hormon fehlen. Dieser Prozess wurde als „Ovarian Dysgenesis“ benannt³. Zu einem späteren Zeitpunkt zeigten Untersuchungen, dass der Grund der ovariellen Zerstörung auf der Basis eines autoimmunen Prozesses beruht. Weitere Untersuchungen mit neugeborenen (neonatalen) thymektomierten (NTx) Mäusen zeigten, dass auch weitere Organe betroffen waren. Je nach untersuchtem Mäusestamm führte eine NTx zu einer Thyreoiditis, Gastritis, Orchitis, Prostatitis oder einer Sialdenitis²⁶.

1973 zeigten Penhale et al. dass eine Thymektomie bei adulten Ratten (ATx), die zusätzlich zweimal in einer Woche zwei Strahlendosen von sublethalen X-Strahlen (2-2.5 Gray) erhielten, eine autoimmune Thyreoiditis und eine Autothyreoglobulin Autoantikörperproduktion aufwiesen²⁷. Wurden normal funktionsfähige T-Zellen von normalen syngenetischen Tieren bei ATx Ratten inokkuliert, welche nach dem oben erwähnten Schema zuvor bestrahlt wurden, so konnten diese Erkrankungen verhindert werden^{28,29}. Spezielle CD4⁺ T-Zellen und CD4⁺CD8⁻ reife Thymozyten verhinderten die durch NTx induzierte murine autoimmune Erkrankung²⁹. Hat sich schon eine Autoimmunität entwickelt, konnte die Erkrankung durch einen CD4⁺ T-Zell Transfer induziert werden. Dies geschieht durch ihre Rolle als T-Helfer Zellen für Autoantikörperbildung und als Wegbereiter für eine zellmedierte Immunzerstörung³⁰. Der normale Thymus produziert eine Population von CD4⁺ Zellen mit autoimmunem, suppressiven Funktionen. Bei 3dTx Mäusen (NTx Mäuse, die 3 Tage *post partum* thymektomiert wurden) hebt sich die durch den Thymus vorbestimmte autoimmune, suppressive Wirkung dieser CD4⁺ Zellpopulation auf. Dies ermöglicht die Aktivierung einer selbstreaktiven CD4⁺ T-Zellpopulation, was zu autoimmunem Erkrankungen führt. Ähnliches gilt für Thymus-stämmige T-Zellen, die durch ATx und

Bestrahlung gehemmt wurden³¹. Ihre Wirkung wird in der Peripherie gehemmt, da sie augenscheinlich durch die Bestrahlung zerstört wurden und aufgrund der Thymektomie nicht ersetzt werden können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei Mäusen und Ratten zwei unterschiedliche Populationen von CD4⁺ T-Zellen gibt. Eine Population mit dem Potential autoimmune Erkrankungen zu mediieren, die andere um dieselben Erkrankungen zu supprimieren³¹.

Natürlich entstehende CD25⁺CD4⁺ T-regulatorische Zellen und deren Rolle in Eigentoleranz

Die oben genannten Beobachtungen werfen nun die Frage auf, inwiefern diese zwei Populationen von CD4⁺ T-Zellen unterschieden werden können. Es wurde versucht die zwei CD4⁺ Zellpopulationen anhand der Expression von Oberflächenmarkern zu trennen^{9,31-36}.

Der Weg zu CD4⁺CD25⁺ Zellen geht über verschiedene Stationen. Anfänglich zeigten Sakaguchi et al., dass BALB/c Mäuse, bei denen CD5^{high}CD4⁺ Zellen depletiert wurden, und deren CD5^{low}CD4⁺ Zellen auf eine BALB/c athymische Maus transferiert wurden, spontan autoimmune Erkrankungen in verschiedenen Organen wie Magen, Schilddrüse, Eierstöcken oder Hoden auslösten³¹. Powrie et al. rekonstituierten PVG athymische nackte Mäuse mit einer Suspension von aus der Milz gewonnenen T-Zellen, die von CD45RC^{low}CD4⁺ depletiert waren. Dadurch konnten sie zeigen, dass ein Transfer von CD45RC^{high}CD4⁺ Zellen in diese Mäuse zu einer systemischen Erkrankung führte, die der Graft versus Host Erkrankung und dem autoimmunen Gewebeuntergang in mehreren Organen, inbegriffen des Thyroids und den Langerhans Inseln, ähnlich ist³⁴. Powrie und Morrissey zeigten unabhängig voneinander, dass der Transfer von CD45RB^{high} CD4⁺ T Zellen zu T und B-Zell defizienten BALB/cSCID Mäusen mit IBD (inflammatory bowel disease) führt³⁷.

Diese Beobachtungen ermutigten Sakaguchi et al. einen spezifischeren Marker als CD5 und CD45RB zu suchen. 1995 konnte ein solches Molekül identifiziert werden⁹. Es handelte sich um das CD25 Molekül, der IL2-Rezeptor der alpha-Kette. Die CD25⁺ Zellen finden sich in 5-10% der peripheren CD4⁺ Zellen, und in weniger als 1% der peripheren CD8⁺ Zellen. Zudem befinden sich die CD25⁺ Zellen in der

gleichen Population wie die CD5^{low} und CD45RB^{high} Zellen. Entfernte man CD4⁺CD25⁺ Zellen, entwickelten sich nicht nur autoimmune Erkrankungen, sondern es kam auch zu einer Verstärkung der immunen Antwort gegenüber fremden Antigenen. Bei Zugabe von CD4⁺CD25⁺ Zellen verschwanden diese Symptome wieder⁹.

Die Entdeckung von FoxP3

2001 wurde das Forkhead Box P3 (FoxP3) Gen erstmals beschrieben¹⁶. Mäuse mit einer spontanen Mutation, welche zum Funktionsverlust des FoxP3 Gens auf einem X-Chromosom führen, sind bekannt als scurfy (sf) mice. Scurfy Mäuse oder Mäuse, bei welchen das FoxP3 Gen deletiert wird, entwickeln eine fatale autoimmunitätsähnliche Erkrankung mit hyperresponsiven CD4⁺T-Zellen^{14,16}.

Beim Menschen führt eine seltene Mutation im Gen, welches zur Kodierung für das FoxP3 zuständig ist, zu einer Erkrankung, die sich Immundysregulation Polyendokrinopathie X-linked Syndrom (IPEX) nennt. Individuen mit dem IPEX Syndrom leiden an einer Reihe von autoimmunen endokrinen Pathologien, autoimmunen Erkrankungen verschiedener Organe, wie Thyreoditis, Inflammatory bowel disease (IBD), sowie Symptomen die schwerwiegende Ekzeme, erhöhte Serum IgE Werte, Eosinophilie und Allergien beinhalten. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass diejenigen regulatorischen T-Zellen, welche FoxP3 exprimieren, eine wichtige Rolle in der Regulation von Autoimmunität sowie der Aufregulierung einer immunologischen Antwort auf Allergene spielen^{17,38,39}. Die Ähnlichkeit von autoimmunen Erkrankungen wie IBD und IPEX zu solchen, die sich bei Mäusen manifestieren, welche von Treg Zellen depletiert sind, gaben mehreren Gruppen Anlass, eine mögliche Rolle von FoxP3 in natürlichen Tregs zu untersuchen^{17,38}.

2003 gaben zwei Forschungsgruppen bekannt, dass FoxP3 in Mäusen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion von Tregs spielt^{17,38}. CD4⁺CD25⁺ periphere T-Zellen und CD4⁺CD8⁻CD25⁺ Thymozyten exprimieren spezifische FoxP3 mRNA^{14,40,41}. Retrovirale Transduktion von FoxP3 in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen konvertierte die Zellen phenotypisch und funktionell in Treg ähnliche Zellen. Diese Zellen zeigten *in vivo* sowie *in vitro* dämpfende Aktivität, *in vitro* Hypoproliferation und

Hypoproduktion von IL-2, eine Aufregulierung von CD25 und anderen Treg Zell assoziierten Molekülen wie CTLA-4 und GITR^{14,40}. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass FoxP3 ein Mastercontroller für die Entwicklung und Funktion von natürlichen CD4⁺CD25⁺ Treg sein könnte.

FoxP3 bei Hunden

Das Vorkommen und die Funktion von FoxP3⁺-Zellen bei Hunden wurde von mehreren Autoren beschrieben.

CD4⁺CD25^{high}FoxP3^{high} Zellen wurden phänotypisch und funktionell charakterisiert⁴². In flowzytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass Hunde mit Krebs erhöhte Werte von FoxP3⁺Zellen exprimieren⁴³. Allerdings wurde soweit noch keine Gruppe von gesunden Hunden untersucht um Referenzwerte für FoxP3⁺ Zellzahlen zu etablieren.

FoxP3 bei Katzen

Bis heute gibt es nur eine sehr limitierte Anzahl von Publikationen was die Untersuchung von FoxP3⁺ Zellen bei der Katze angeht. Lankford et al. haben CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen identifizieren können⁴⁴. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass eine Infektion mit dem feline Immunschwächevirus (FIV) zur Aktivierung von immunsuppressiven CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen führt⁴⁵. Allerdings wurde auch bei Katzen bis dato noch keine Gruppe gesunder Katzen für die Erstellung von Referenzwerten von FoxP3⁺ Zellzahlen untersucht.

Ziel der Studie

Wie dargelegt wurden regulatorische T-Zellen, speziell CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, bisher nicht bei gesunden Hunden und Katzen quantifiziert. Das Ziel dieser Studie ist es daher die Methodik zur Detektion von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen mittels Flowzytometrie zu etablieren und damit Tregs bei gesunden Katzen und Hunden zu quantifizieren und zu vergleichen, sowie den Einfluss einer mitogenen Stimulation auf den Prozentsatz der Treg bei Hund und Katze zu bestimmen.

Material und Methoden

Hunde und Katzen

Einschlusskriterien

Die Studienpopulation umfasste gesunde Katzen und Hunde (n = 10 Katzen, n = 20 Hunde). Das Einschlusskriterium „gesund“ wurde durch die Anamnese und einem klinischen Untersuchung geprüft.

Die Tiere sollten keine entzündlichen und/oder infektiösen Krankheiten haben. Über die klinische Anamnese und den klinischen Untersuchung wurden autoimmune, neoplastische, chronische und systemische Erkrankungen ausgeschlossen. Gab es aufgrund der Untersuchung keine Hinweise auf Erkrankungen, so wurden die Tiere als „gesund“ eingestuft. Die Tiere durften innerhalb eines Monats vor der Beprobung nicht geimpft sein; dadurch sollte eine Modulation des Immunsystems durch den Impfstoff ausgeschlossen werden. Weiter durften die Hunde und Katzen zum Zeitpunkt der Beprobung keine Medikamente erhalten, welche zur Unterdrückung einer Immunantwort führen könnten. Zu diesen Medikamenten gehörten Glucocorticoide, Chemotherapeutika, Calcineurininhibitoren und Antihistaminika.

Tierversuchsbewilligung

Die Blutentnahmen erfolgten im Rahmen der TVB: 142/2013.

Blutentnahme und Aufbewahrung der Proben

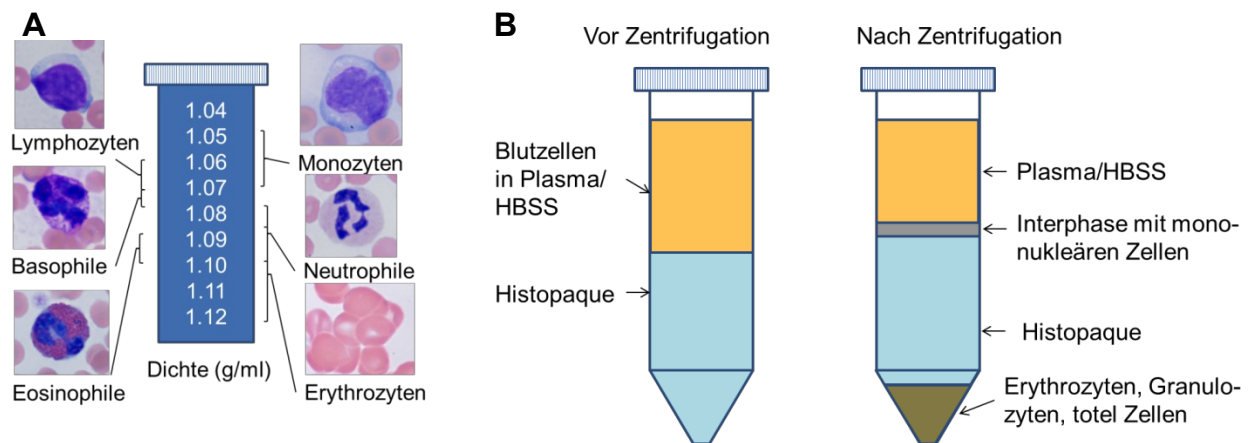
Die Blutentnahme wurde durch eine Besitzereinverständniserklärung genehmigt (siehe Anhang). Das Blut wurde über die Jugularvene anhand einer 22G Kanüle und einer 5 ml Spritze gewonnen und in ein K3EDTA-Vacurette Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) mit einem Volumen von 2 ml gegeben.

Zur Aufbewahrung wurde das Blut bei Raumtemperatur gelagert. Die Verarbeitung des Blutes erfolgte innerhalb von 24 Stunden.

PBMC Isolation durch Dichtegradient-Zentrifugation

PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden in einem Laminarflow, einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank, unter sterilen Bedingungen isoliert, um eine Kontamination der Umwelt und der Proben zu vermeiden. Zur Vorbereitung wurden zwei 15 ml Falcon-Röhrchen vorbereitet. Ein Röhrchen wurde mit 4 ml Histopaque (Histopaque-1077 von Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Ref.: H8889) gefüllt. Histopaque ist eine Zuckerlösung mit einer Dichte von 1077 mosmol. Es diente dazu, die PBMCs von den restlichen Blutbestandteilen zu trennen (siehe auch Abbildung 1). Das zweite Röhrchen wurde mit 12 ml HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution von Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA Ref.: 14175-053) gefüllt. Das Blutentnahmeröhrchen (2 ml K3EDTA-Vacurette Röhrchen) wurde auf Höhe der tatsächlichen Füllung markiert. Die Blutprobe in dem 2 ml K3EDTA Röhrchen wurde für die Katze mit 170 x g bei 18°C für 10 Minuten, für den Hund mit 1580 x g bei 22°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die überstehende Plasma-Fraktion mittels einer Pasteur-Pipette abpipettiert und in ein 2 ml Cryotube gefüllt. Das Cryotube wurde für weitere Untersuchungen des Plasmas bei -80°C gelagert. Das abpipettierte Plasma wurde mit HBSS bis auf Höhe der Markierung ersetzt. Der Inhalt wurde mit einer Pasteurpipette gut vermischt und vorsichtig in das Röhrchen über das Histopaque geschichtet. Dabei wurde das Röhrchen in einem Winkel von 45° gehalten. Das Blut-HBSS-Gemisch sollte sich nicht mit dem Histopaque vermischen. Es folgte eine Auftrennung der verschiedenen Bestandteile des Blutes mittels Dichtegradienten-Zentrifugation, wobei das Röhrchen mit 700 x g für 30 Minuten bei 22°C zentrifugiert wurde (siehe Abbildung 1A). Dabei bildete sich zwischen der Histopaque-Schicht und der HBSS-Schicht ein Schleier, der aus PBMCs bestand (siehe Abbildung 1B). Die restlichen Bestandteile des Blutes befanden sich unterhalb der Histopaque-Schicht.

Abbildung 1: A) Dichtegradient der unterschiedlichen Zellen. Die Dichte der verschiedenen Zellpopulationen ist tierartlich unterschiedlich. B) Dichtegradientenzentrifugation: Schichten vor und nach der Zentrifugation.



Diese Schicht mit PBMCs wurde mittels einer Pasteurpipette abpipettiert, und die Zellen in das zweite Falcon-Röhrchen (12ml HBSS) gegeben. Das Röhrchen wurde mit 170 x g bei 22°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet aus PBMCs wurde in 400 µl PBS (Posphat buffered saline) + 3% fetalems Kälber-Serum (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, US) resuspendiert. Ein Aliquot von 200 µl wurde für die direkte Messung der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen genutzt (siehe unten), die anderen 200 µl wurden erneut bei 170 x g bei 22°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dieses Pellet wurde entweder zur direkten Messung der Tregs genutzt, für eine Zellkultur mit Stimulations-Reagenzien verwendet, oder mittels RecoveryTM - Cell Culture Freezing Medium (Gibco 12648-010, Grand Island, NY, US) eingefroren. Die eingefrorenen PBMCs wurden im Rahmen eines weiteren Projektes genutzt.

Zellkultur und Stimulation

Ein Pellet mit 10⁶ PBMC (Zellen gezählt mittels Neubauer-Zählkammer) wurde mit 2 ml RPMI-komplett-Medium resuspendiert. Die Zusammensetzung des RPMI-komplett-Mediums bestand aus RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, US R-0883), 10% FCS (x Minuten bei x°C hitze-inaktiviert), 1% L-Glutamin (Gibco 25030-024, Grand Island, NY, US) und 1% Antibiotic/Antimycotic (Gibco 15240-062, Grand Island, NY, US).

Dieses Zellsuspensat wurde in eine Vertiefung einer 12 Well-Platte gegeben. Zusätzlich wurden pro 1 ml Zellsuspensat (10^6 Zellen) 1 μ l Concanavalin A (C5275-5MG Sigma-Aldrich, St. Louis, US, C5275-5MG)(Con A; 5 μ g/ μ l), 62,5 μ l humanes rekombinantes IL-2 (100 IU) und 2 μ l humanes rekombinantes TGF-beta (PePreproTech®, Rocky Hill, NJ 08553 US) (1 ng/ μ l) hinzugefügt. Die Stimulationsbedingungen wurden in Anlehnung der Arbeit von Biller et al. gewählt

46

Die Zellkultur wurde für zwei Tage in einen Wärmeschrank mit einer Umgebung von 5% CO₂ und 37°C gelagert. Nach zwei Tagen wurde die Zellkultur in ein 4,5 ml Röhrchen (Sarsted Ref.: 57.477) transferiert. Dieses Röhrchen wurde mit 170 x g bei 22°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Pipette abgesaugt und das Pellet mit 200 μ l PBS + 3% FCS resuspendiert.

Markierung der PBMC mittels Antikörper

PBMCs wurden zum einen, wie oben erwähnt, direkt aus K3EDTA Vollblut isoliert, zum anderen aus der Zellkultur gewonnen und in 200 μ l PBS + 3% FCS resuspendiert.

Für die Katze sowie für den Hund wurden drei Ansätze in drei verschiedenen Röhrchen vorbereitet. Röhrchen 1 wurde für die Markierung mit CD4, CD25, FoxP3 vorbereitet, Röhrchen 2 wurde für die Isotypkontrolle und Röhrchen 3 für die Negativkontrolle vorbereitet. Die Isotypkontrolle sowie die Negativkontrolle wurde bei der Flowzytometrie verwendet, um Zellen mit einer niedrigen Fluoreszenz, die negativen Zellen, sprich solche, die nicht markiert wurden, von denjenigen mit hoher Fluoreszenz markierten Zellen zu unterscheiden. Für die Markierung des Blutes gesunder Katzen wurden folgende Antikörper verwendet: Mouse Anti-Cat CD4-R-Phycoerythrin (RPE); Verdünnung 1:5 (Die Verdünnungen wurden vorgängig durch Titrationsversuche bestimmt und optimiert) (AbDserotec, Raleigh, NC, USA, Ref.: MCA 1346-PE), CD25-Fluorescein Isothiocyanat (FITC) (grosszügig zur Verfügung gestellt durch Mary Tompkin's lab); Verdünnung 1:100 und Anti-FoxP3 eFluor® (AbDserotec, Raleigh, NC, USA, Ref.: 50-4774); unverdünnt.

Für die Markierung des Blutes von gesunden Hunden wurden folgende Antikörper verwendet: Rat Anti-Dog CD4-FITC (AbDserotec, Raleigh, NC, USA, Ref.: MCA 1038F); Verdünnung 1:5, Anticanine CD25-RPE (eBioscience, San Diego, CA, USA Ref.: 12-0250) und Anti FoxP3 eFluor® (eBioscience, San Diego, CA, USA, Ref.: 50-4774). Für die Isotypkontrolle wurden bei beiden Spezies folgende Produkte benutzt: Mouse IgG1 Negative Control FITC (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA, Ref: MCA 928F), Mouse IgG1 Negative Control PE (AbD Serotec, Raleigh, NC, USA, Ref: MCA928PE) und Mouse IgG1 K Isotype Control eFluor® 660 (ebioscience, San Diego, CA, USA, Ref.: 50-4714). Der Negativkontrolle wurden keine Antikörper zugesetzt.

Schritt 1: In alle drei Röhrchen wurden 50 µl Zellsuspension gefüllt.

Dem Röhrchen 1 (Zellsuspension für die Färbung von CD4, CD25, FoxP3) wurden 5 µl CD4 Antikörper und 5 µl CD25 Antikörper zugegeben; diese Antikörper bindeten auf der Zelloberfläche. Röhrchen 2 (Zellsuspension für die Isotypkontrolle) wurden die Antikörper für die Isotypen von je 5 µl FITC, 5 µl RPE und 5 µl Alexafluor 660 zugegeben. Nach der Zugabe der Antikörper wurden die Tubes mit Vortex gemischt, damit sich die Antikörper gut mit dem Zellsuspensat vermischten. Röhrchen 3 (Zellsuspension für die Negativ Kontrolle) blieb unbehandelt. Die Antikörper wurden für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml PBS+3% FCS hinzugegeben, gevortext und zentrifugiert mit 400 x g für 5 Minuten bei 22°C. Der Überstand wurde bei allen Röhrchen mittels einer Mikropipette abgesaugt.

Schritt 2: Zu den Pellets wurden 1 ml FoxP3 Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (ebioscience, San Diego, CA, USA, Ref.:00-5521-00) zugegeben und leicht geschüttelt. Die Lösung wurde bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. In diesem Schritt wurden die PBMCs fixiert und Zell- und Kernmembran perforiert, damit im nächsten Schritt der Antikörper für FoxP3 in den Zellkern eindringen konnte, da FoxP3 nicht wie CD4 und CD25 auf der Oberfläche, sondern im Nukleus exprimiert wird. Nach 30 Minuten Inkubation wurden 2 ml Permeabilization Buffer (10X) (ebioscience, San Diego, CA, USA, Ref.: 00-8333-56) hinzugegeben, die Lösungen wurden gut vermischt und die Röhrchen wurden mit

400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit den Zellen wurde in 100 µl Permeabilization Buffer (10X) resuspendiert.

Schritt 3: In das Röhrchen 1 wurden 2,5 µl FoxP3 Antikörper hinzugefügt. Alle Röhrchen wurden wieder bei 4°C für 30 Minuten in den Kühlschrank zum inkubieren gestellt. Nach 30 Minuten wurden 2 ml Permeabilization Buffer (10X) zur Lösung hinzugefügt. Diese Lösung wurde mit 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und erneut mit 2 ml Permeabilization Buffer (10X) gefüllt. Die Lösung wurde zentrifugiert mit 400xg für 5 Minuten, und der Überstand wurde abgesaugt.

Dieses Pellet war nun bereit für die Messung mittels Flowzytometrie. Hierfür suspendierte man das Pellet mit 200 µl PBS + 3% FCS. Ein Aliquot von 50 µl des Suspensats wurde in eine Vertiefung einer 96 Well-Platte verbracht und weiter mit 150 µl PBS + 3% FCS verdünnt.

Messung der markierten PBMCs

Die Messung erfolgte erstmals mittels Guava easy Cyte 8HT Flow Cytometer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Von jeder Probe wurden 10'000 Zellen gemessen. Erst wurde die Lymphozytenfraktion gemäss der typischen forward (Grösse, Volumen der Zellen) und side (Oberflächeneigenschaften, Grösse und Struktur des Zellkerns und Menge der Vesikel) scatter Eigenschaften bestimmt (gatatet) ⁴⁷ (siehe Abbildung 2).

Zellen positiv für CD4 wurden im FITC Histogramm gatatet (siehe Abbildung 3), Zellen positiv für CD25 im RPE Histogramm (siehe Abblidung 4) und Zellen positiv für FoxP3 im Alexafluor 660 Histogramm (siehe Abbildung 5).

Die Zahl der Tregs wurde als Prozentsatz der gesamten CD4+ Zellpopulation gewertet (siehe Abbildung 6-8).

Abbildung 2: Bestimmung der Lymphozytenfraktion nach typischen Forward und Side Scatter gated

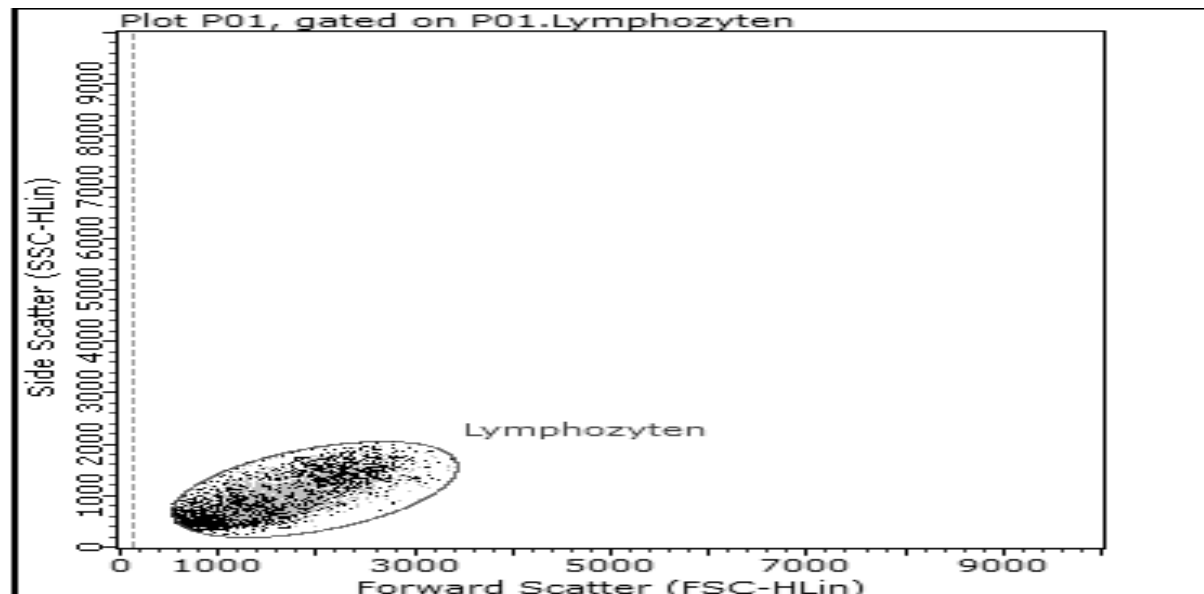


Abbildung 3: Histogramm mit Auswahl der CD4+ Zelle

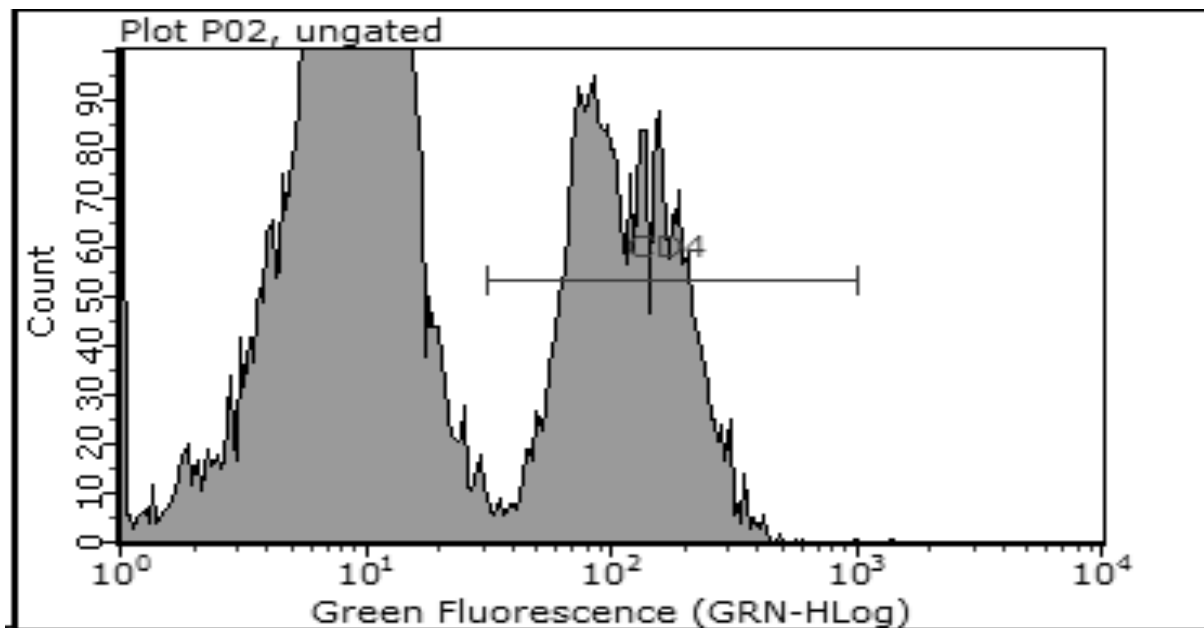


Abbildung 4: Histogramm mit Auswahl der CD 25+ Zellen

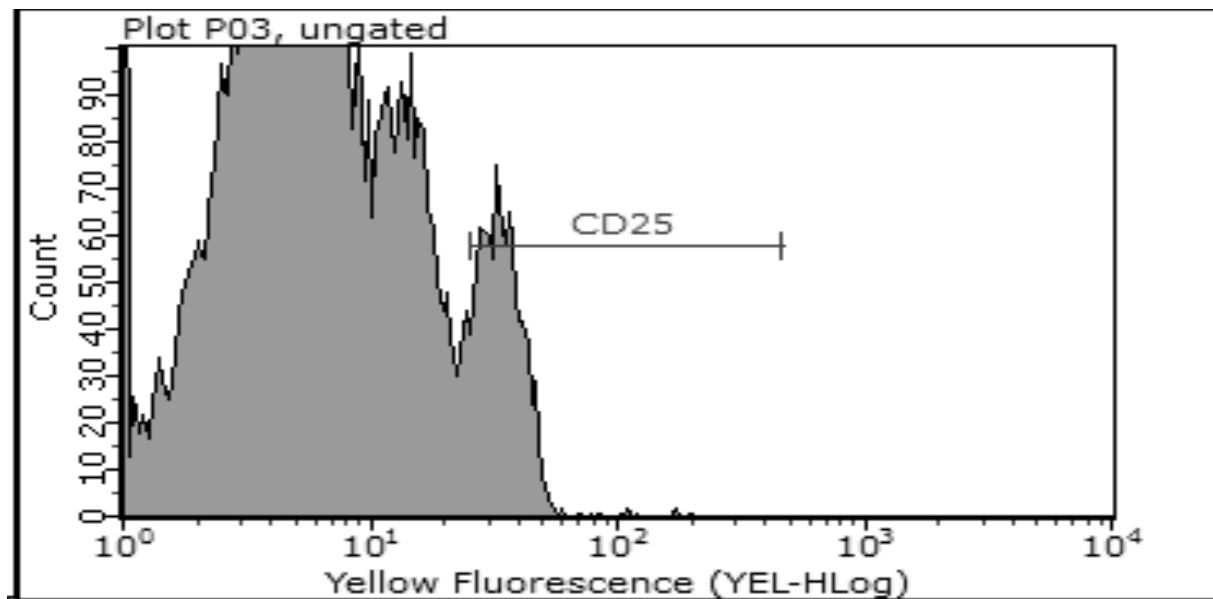


Abbildung 5: Histogramm mit Auswahl der FoxP3+ Zellen

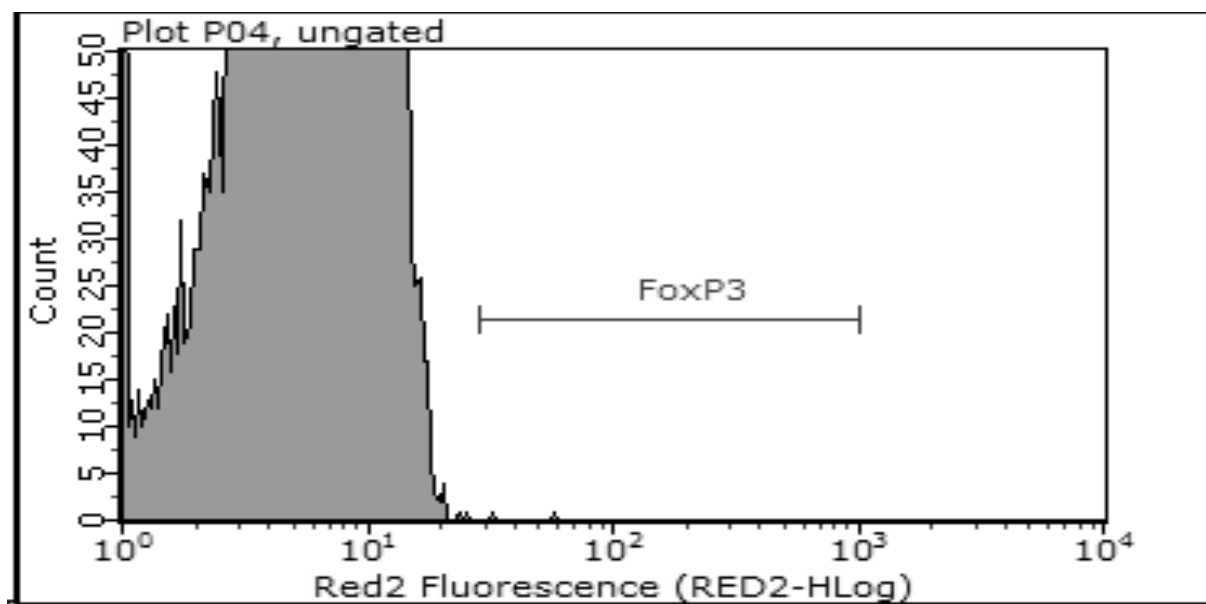


Abbildung 6: Dotplot mit Abbildung von CD4+ und CD25+ Zellen

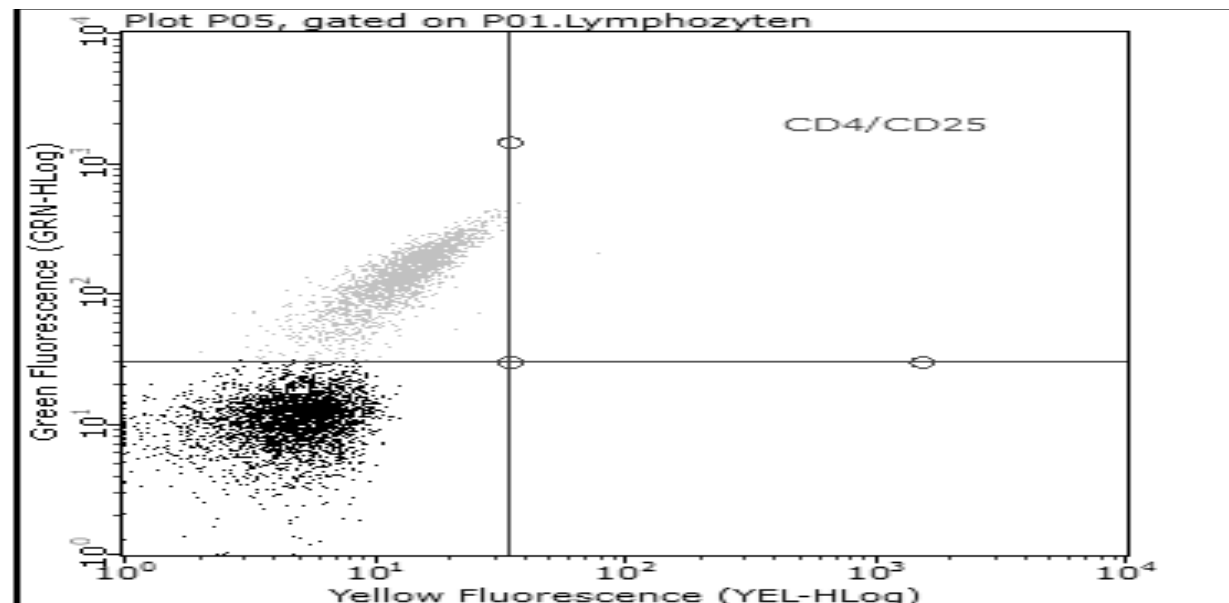


Abbildung 7: Dotplot mit Abbildung von CD4+ und FoxP3+ Zellen

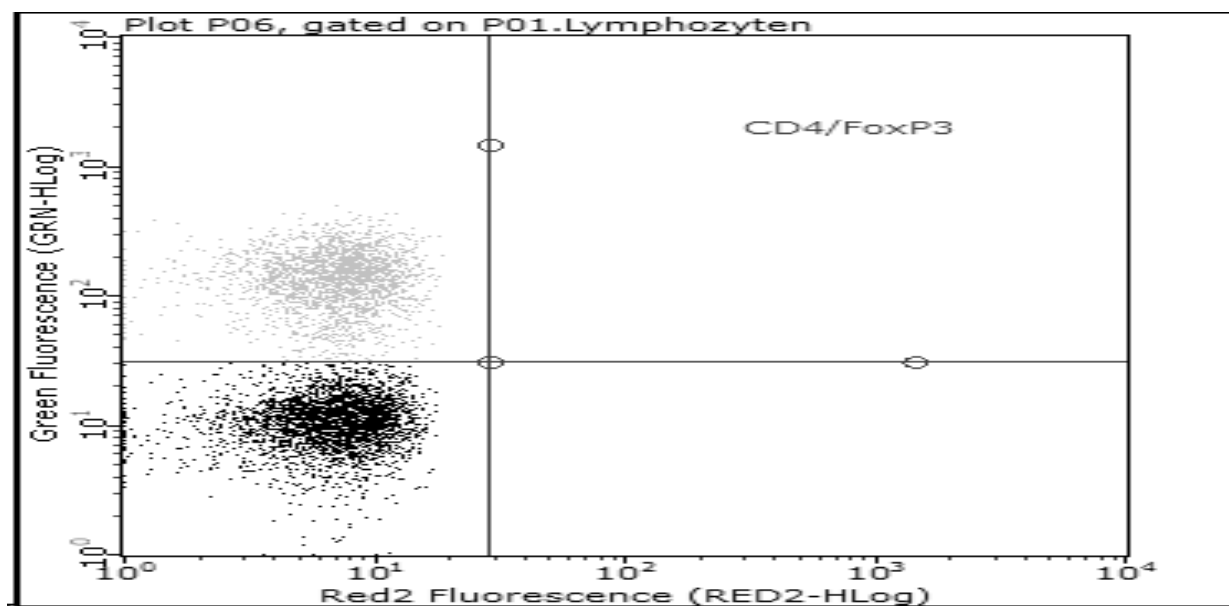
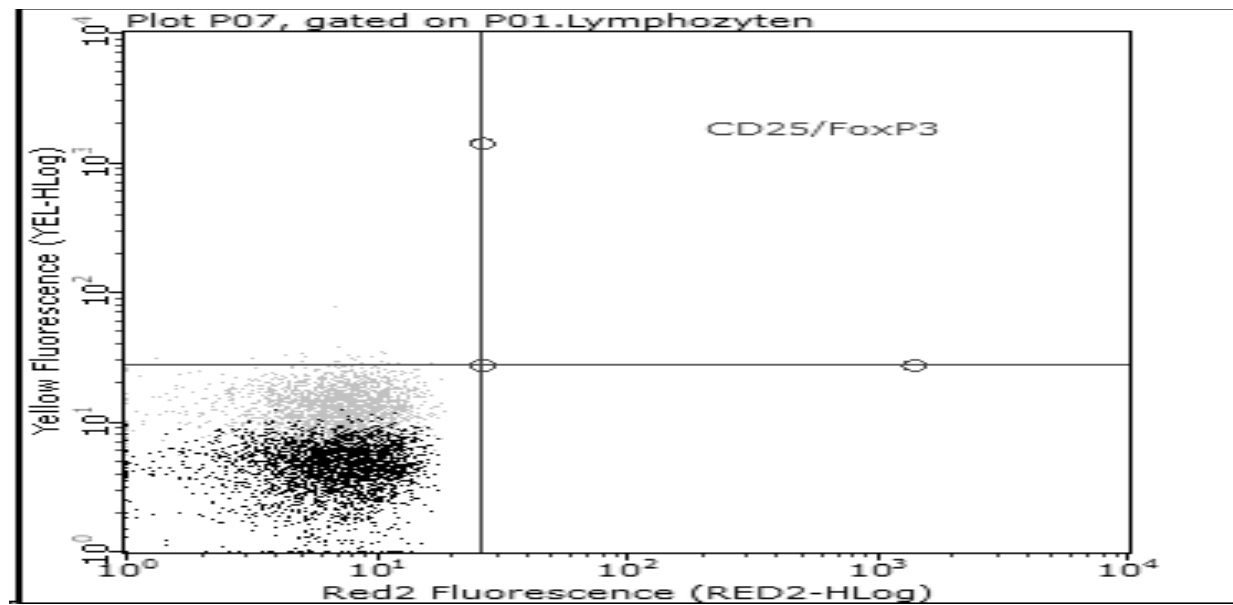


Abbildung 8: Dotplot mit Abbildung von CD25+ und FoxP3+ Zellen



Tregs im PBMC wurden über die Markierung identifiziert als (siehe auch Tabelle 2):

1. CD4+FoxP3+ (Zellen welche positiv für CD4 und FoxP3 sind) in der gesamten Lymphozytenpopulation
2. FoxP3+ und CD25+FoxP3+ (Zellen welche nur positiv für FoxP3 sind, und solche die positiv für CD25 und FoxP3 sind) in der gesamten Lymphozytenpopulation
3. CD25+ und CD25+FoxP3+ (Zellen welche nur positiv für CD25, und solche die positiv für CD25 und FoxP3 sind) in der gesamten Lymphozytenpopulation
4. CD25+FoxP3+ (Zellen welche positiv für CD25 und FoxP3 sind) in der gesamten Lymphozytenpopulation
5. CD4+CD25+ (Zellen welche positiv für CD4 und CD25 sind) in der gesamten Lymphozytenpopulation
6. CD4+ (Zellen welche positiv für CD 4 sind) in der gesamten Lymphozytenpopulation

Analyse der Daten

Die Daten wurden mittels „Analyse It“ (Version 2.22, Analyse-it Software, Ltd., Leeds, UK) in Excel (Excel 2011, Microsoft, Redmond, WA, USA) analysiert, wobei der non-parametrische Kruskal-Wallis Test verwendet wurde für den Vergleich von stimulierten zu unstimulierten Tregs. Der Unterschied in der Expression zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen wurde als signifikant erachtet, wenn $p < 0.05$ war.

Resultate

In dieser Studie wurden PBMCs von gesunden Hunden und Katzen auf die Häufigkeit von Tregs untersucht. Im Speziellen sind das Zellen welche über die Marker $CD4^+$, $CD25^+$ und $FoxP3^+$ identifiziert wurden.

Es wurden Lymphozyten auf die Häufigkeiten des Vorkommens der markierten Zellen untersucht und anschliessend die Zusammensetzung mit der höchsten Aussagekraft ausgewählt.

Tabelle 2: Unterteilung der Zellpopulationen aufgrund verschiedener Markierungen

1. $CD4^+FoxP3^+$
2. $FoxP3^+$ und $CD25^+FoxP3^+$
3. $CD25^+$ und $CD25^+FoxP3^+$
4. $CD25^+FoxP3^+$
5. $CD4^+CD25^+$
6. $CD4^+$

Hunde

Die Population der Hunde setzte sich aus zwanzig Hunden folgender Rassen zusammen: Vier Barsois, vier Mischlinge, drei Entlebucher Sennenhunde, ein Beagle, ein Boxer, eine American Bulldogge, ein kleiner Münsterländer, ein Labrador Retriever, ein Golden Retriever, ein bayrischer Gebirgsschweisshund, ein Leonberger und ein Treeing Walker Coonhound. Von den zwanzig Hunden waren fünfzehn weiblich, davon fünf kastriert, und fünf männlich, davon zwei kastriert. Die untersuchten Hunde waren im Alter von einem halben Jahr bis 10 Jahre. Der Median lag bei 2.1 Jahren. Das Gewicht der Hunde lag zwischen 14 und 50 Kilogramm mit einem Median von 25.35 kg. Für Details der einzelnen Hunde siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Details der in dieser Studie untersuchten 20 gesunden Hunde

Hund	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Stimulation der PBMC (J/N)
1	Barsoi	F	0.6	30	J
2	Barsoi	M	5.6	47.7	J
3	Barsoi	F	2.6	37	N
4	Barsoi	F	5.6	35	N
5	Mischling	F	0.6	22	N
6	Mischling	FK	10	14	N
7	Mischling	WK	7	28	J
8	Labrador-Mischling	FK	7.11	26.1	J
9	Entlebucher Sennenhund	M	1.1	21	J
10	Entlebucher Sennenhund	F	0.6	22	N
11	Entlebucher Sennenhund	F	1.5	25	N
12	Beagle	MK	8.7	14	J
13	Boxer	F	0.4	26	J
14	American Bulldog	M	1.4	39	J
15	kleiner Münsterländer	WK	1.9	24	J
16	Labrador Retriever	FK	2.3	22	J
17	Golden Retriever	F	0.5	25.7	N
18	Bayrischer Gebirgsschweishund	F	1.4	17	N
19	Leonberger	F	4.6	50	N
20	Treeing Walker Coonhound	MK	8.4	17	N

F = weiblich, M = männlich; FK = weiblich kastriert; MK = männlich kastriert

Resultate für Tregs von gesunden Hunden

Zur Bestimmung normaler Werten von Tregs wurden die 20 oben beschriebenen gesunden Hunden beprobt (Tabelle 3). Nachfolgend wurden die Ergebnisse nach den oben genannten Unterteilungen der Zellpopulationen aufgrund verschiedener Markierungen angeschaut (Tabelle 2). Die Werte für die gesunden Hunde wurden in Tabelle 4 aufgeführt und in Abbildung 9 und 10 dargestellt.

Tabelle 4: Verschiedene Zellfraktionen bei gesunden Hunden (n = 20) in Prozent von der Gesamtlymphozytenpopulation

Markierung	Mittelwerte; SD	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
CD4⁺FoxP3⁺	1.74 (+/-0.97)	0.29	0.98	1.59	0.99 - 2.15	2.43	3.57	1.45
FoxP3⁺ und CD25⁺FoxP3⁺	3.20 (+/-1.41)	0.44	2.16	3.28	2.29 - 3.94	4.06	6.03	1.90
CD25⁺ und CD25⁺FoxP3⁺	4.54 (+/-4.09)	0.31	2.01	3.11	2.2 - 4.89	6.19	13.2 4	4.17
CD25⁺FoxP3⁺	1.36 (+/-1.93)	0.02	0.43	0.81	0.47 - 1.44	1.45	9.03	1.01
CD4⁺CD25⁺	1.69 (+/-1.46)	0.16	0.74	1.15	0.80 - 1.85	2.00	5.16	1.26 2
CD4⁺	43.36 (+/-13.85)	29.2	37.3	43.4	37.4 - 47.2	50.1	87.4	12.8

CI = Confidence Intervalle; IQR = Inter Quartile Intervall

Abbildung 9: Boxplot Darstellung der CD4⁺-Zellzahlen (Prozent der Lymphozytenfraktion) bei gesunden Hunden (n = 20). Die Boxen erstrecken sich vom 25% - 75% Wert; die Whisker erstrecken sich vom 5% - 95% Wert. Ausreisser werden als + dargestellt.

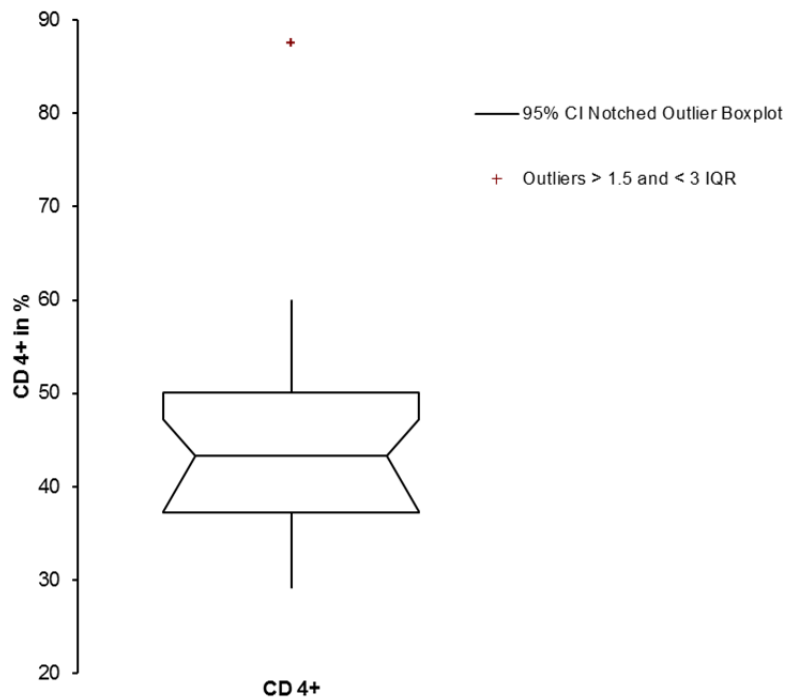
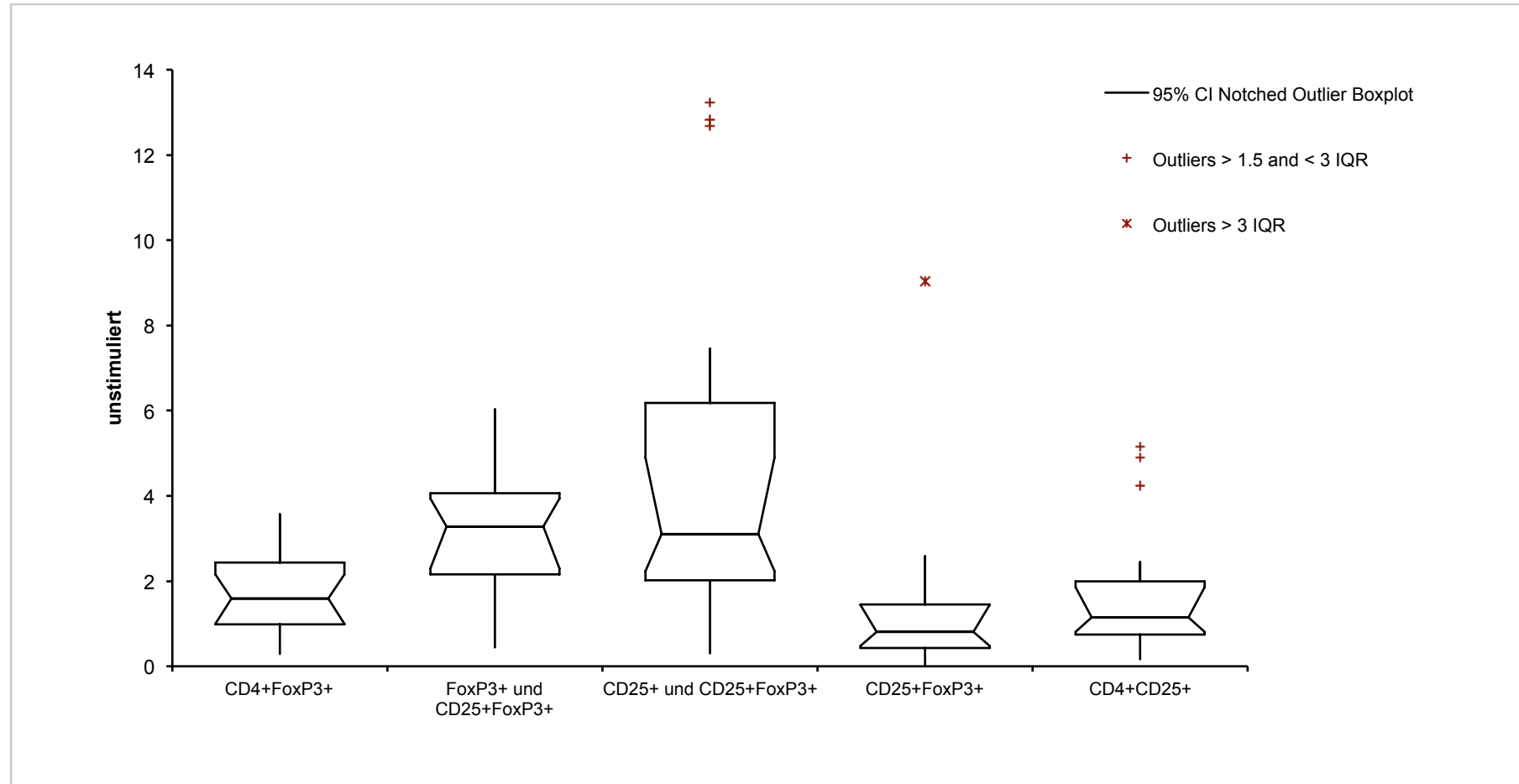


Abbildung 10: Boxplot Darstellung der Werte bei gesunden Hunden (n = 20). Die Boxen erstrecken sich vom 25% - 75% Wert; die Whisker erstrecken sich vom 5% - 95% Wert. Ausreisser werden als + dargestellt.



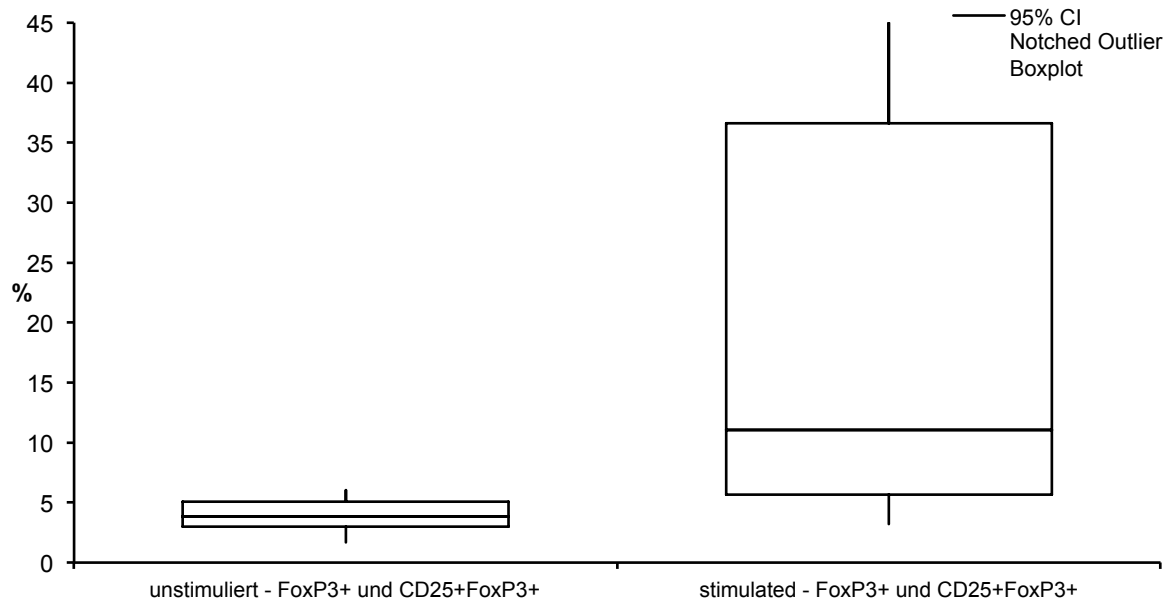
Stimulation von PBMCs beim Hund

In einem Vorversuch wurden PBMCs von zehn (siehe Tabelle 3) der insgesamt zwanzig gesunden Hunde isoliert. Diese PBMCs wurden in der Zellkultur mit Zugabe von Con A, IL2 und recombinant human TGF-beta (PePreproTech®, Rocky Hill, NJ 08553 US) stimuliert. Diese Mitogenstimulation führte zu einer erhöhten Expression von FoxP3. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen mittels Flowzytometrie auf Oberflächenmarker und FoxP3⁺ Expression analysiert. Die Werte der stimulierten Zellen wurden mit denjenigen Werten von Zellen ohne Stimulation verglichen. Die Werte aller Populationen waren nach Stimulation signifikant höher als vor der Stimulation (Tabelle 5 und Abbildung 11).

Tabelle 5: Vergleich der Zellpopulationen mit und ohne Stimulation bei gesunden Hunden (n = 10)

Markierung	Ohne Stimulation (%) Median (Min.-Max.)	Mit Stimulation (%) Median (Min.-Max.)	Average Stimulation Factor	p-Wert (Kruskal- Wallis)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	1.74 (0.29 - 3.57)	5.51 (1.4 - 29.0)	6.83	0.013
FoxP3 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	3.85 (1.68 - 6.03)	11.1 (3.21 - 45.0)	5.59	0.002
CD25 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	4.62 (1.86 - 13.2)	50.7 (17.91 - 95.6)	14.62	0.002
CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	1.10 (0.34 - 2.59)	7.86 (1.13 - 44.1)	20.34	0.0098
CD4 ⁺ CD25 ⁺	1.35 (0.65 - 5.16)	31.1 (5.26 - 62.1)	23.04	0.002
CD4 ⁺	44.07 (33.0 - 59.1)	41.5 (26.7 - 67.4)	1.01	0.002

Abbildung 11: Boxplot Darstellung der FoxP3⁺ und CD25⁺FoxP3⁺-Werte von unstimulierten PBMCs vs stimulierten PBMCs bei gesunden Hunden (n = 10). Die Boxen erstrecken sich vom 25% - 75% Wert; die Whisker erstrecken sich vom 5% - 95% Wert. Ausreisser werden als + dargestellt (hier keine vorhanden).



Katzen

Die Population der untersuchten Katzen setzte sich aus zehn Katzen folgender Rassen zusammen: Acht Europäische Kurzhaarkatzen, eine Bengal- und eine Burmakatze. Von den zehn Katzen waren sieben weiblich, davon drei kastriert, und drei männlich. Das Alter der Katzen lag zwischen 0.5 Jahren und 4.5 Jahren. Der Median lag bei 7 Monaten. Das Gewicht der Katzen betrug zwischen 2.45 und 3.7 kg mit einem Median von 2.9 kg. Für Details der einzelnen Katzen siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Details der in dieser Studie untersuchten 10 gesunden Katzen

Katzen	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)	Stimulation der PBMC (J/N)
1	EKH	MK	5mt	2.8	J
2	EKH	F	7mt	2.6	J
3	EKH	M	5mt	3.45	N
4	EKH	F	6mt	2.45	N
5	EKH	F	7mt	2.9	N
6	EKH	F	7mt	3	N
7	EKH	F	7mt	2.9	J
8	EKH	F	7mt	2.9	J
9	Bengal	M	4.7	3.7	J
10	Burma	F	1.1	3.4	N

EKH = Europäische Kurzhaarkatze; F = weiblich, M = männlich; FK = weiblich kastriert

Resultate von Messwerten für Tregs von gesunden Katzen

Zur Bestimmung von Werten von Tregs wurden die 10 der oben beschriebenen gesunden Katzen beprobt. Nachfolgend wurden die Ergebnisse nach den oben genannten Gesichtspunkten angeschaut. Die Werte für die Katze wurden in Tabelle 7 wiedergegeben und in Abbildung 12 und 13 dargestellt.

Tabelle 7: Verschiedene Zellfraktionen von gesunden Katzen (n = 10) in Prozent von der Gesamtlymphozytenpopulation

Markierung	Mittelwerte Standart- abweichung	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
CD4⁺FoxP3⁺	0.14 (+/-0.09)	0.03	0.08	0.13	0.04 - 0.18	0.17	0.35	0.09
FoxP3⁺ und CD25⁺FoxP 3⁺	0.25 (+/-0.11)	0.05	0.18	0.23	0.17 - 0.36	0.34	0.44	0.16
CD25⁺ und CD25⁺FoxP 3⁺	0.39 (+/-0.22)	0.23	0.26	0.28	0.25 - 0.58	0.44	0.99	0.18
CD25⁺FoxP 3⁺	0.02 (+/-0.02)	0.00	0.01	0.02	0.00 - 0.05	0.03	0.07	0.02
CD4⁺CD25⁺	0.33 (+/-0.19)	0.15	0.22	0.26	0.15 - 0.42	0.42	0.84	0.20
CD4⁺	18.47 (+/-9.10)	6.21	12.2	16.8	11.2 - 27.8	23.8	39.03	11.6

CI = Confidence Intervalle; IQR = Inter Quartile Intervall

Abbildung 12: Boxplot Darstellung der CD4⁺-Zellzahlen (Prozent der Lymphozytenfraktion) bei gesunden Katzen (n = 10). Die Box erstreckt sich vom 25% - 75% Wert; der Whisker erstrecken sich vom 5% - 95% Wert. Ausreisser werden als + dargestellt.

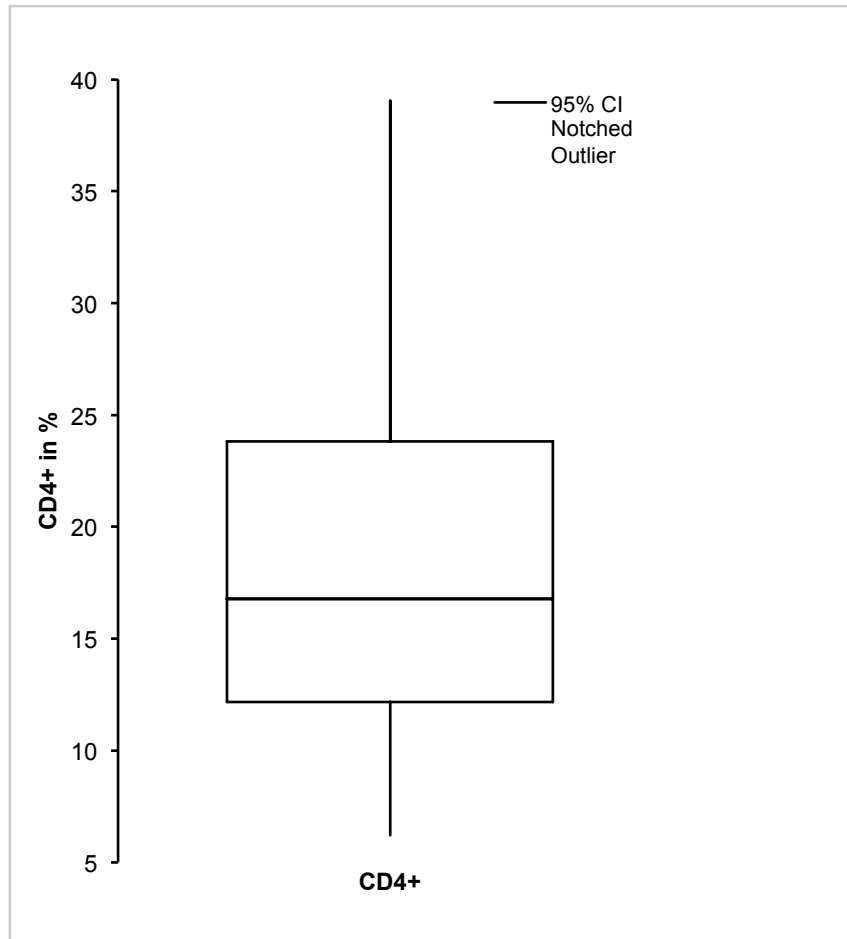
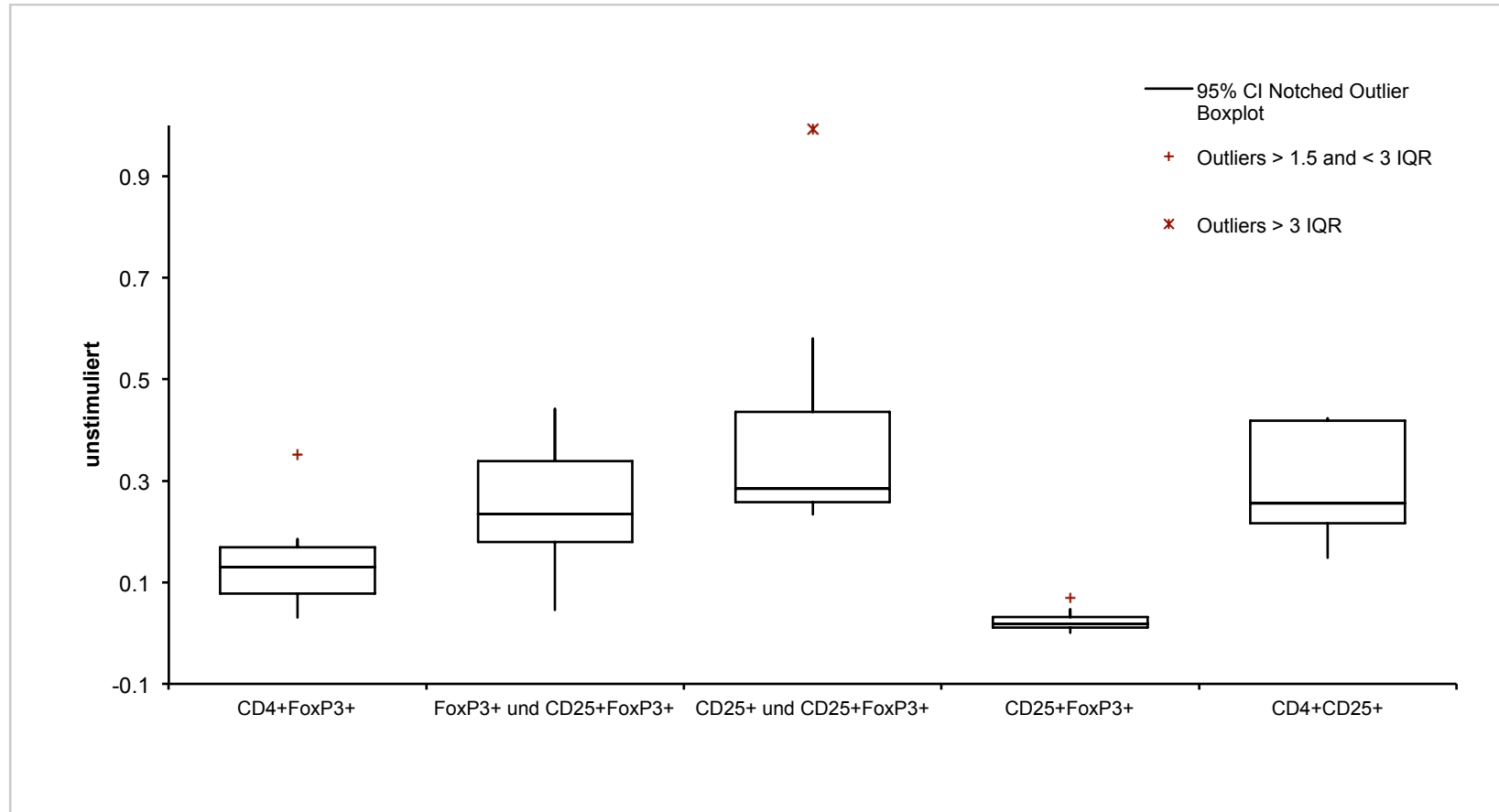


Abbildung 13: Boxplot Darstellung der Werte bei gesunden Katzen (n = 10). Die Boxen erstrecken sich vom 25% - 75% Wert; die Whisker erstrecken sich vom 5% - 95% Wert. Ausreisser werden als + dargestellt..



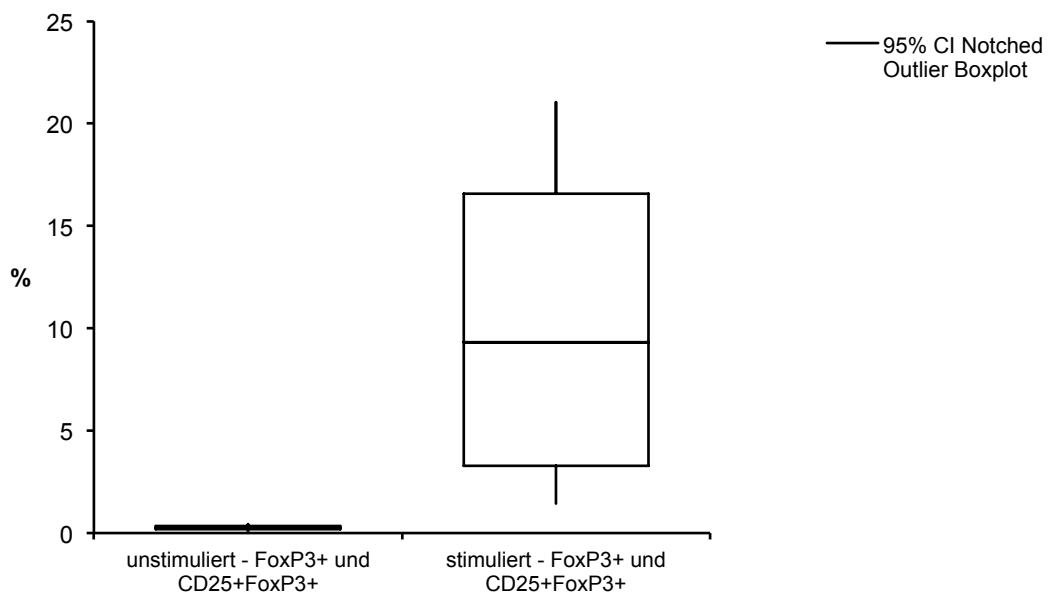
Stimulation von PBMCs bei der Katze

In einem Vorversuch wurden PBMCs von allen zehn Katzen isoliert und in einer Zellkultur mit der Zugabe von Con A, IL2 und TGF- β stimuliert. Das Ziel dieses Vorversuchs bestand darin, die Antikörper auf ihre Spezifität bezüglich ihrer Marker zu testen. Dies war nötig, da die Werte für Tregs bei den Katzen extrem tief waren und somit ohne Stimulation nicht sicher gezeigt werden konnte, ob es sich bei den Messungen um Messfehler handelte. Weiter sollten die Werte der unstimulierten PBMCs mit denen der stimulierten PBMCs verglichen werden. Alle Populationen waren nach der Stimulation signifikant höher also vor der Stimulation (Tabelle 8 und Abbildung 14).

Tabelle 8: Vergleich der Zellpopulationen ohne und mit Stimulation der PBMCs bei Katzen ($n = 10$)

Marker	Ohne Stimulation (%) Median (Min.-Max.)	Mit Stimulation (%) Median (Min.-Max.)	Average Stimulation Factor	p-Wert (Kruskal- Wallis)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	0.13(0.03 - 0.35)	5.54(1.27 - 16.3)	63.27	0.005
FoxP3 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0.23 (0.05 - 0.44)	9.32 (1.42 - 21.1)	48.18	0.002
CD25 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0.28 (0.26 - 0.44)	5.90 (4.02 - 7.40)	22.74	0.002
CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0.02 (0.00 - 0.03)	0.98 (0.08 - 1.65)	61.46	0.002
CD4 ⁺ CD25 ⁺	0.26 (0.15 - 0.84)	5.18 (1.19 - 10.3)	22.9	0.002
CD4 ⁺	16.76 (6.21 - 39.0)	32.72 (22.9 - 63.3)	2.6	0.002

Abbildung 14: Boxplot Darstellung der FoxP3⁺-Werte von unstimulierten PBMCs vs stimulierte PBMCs bei gesunden Katzen (n = 10; exemplarische Abbildung). Die Box erstreckt sich vom 25% - 75% Wert; der Whisker erstrecken sich vom 5% - 95% Wert. Ausreisser werden als + dargestellt (hier keine vorhanden).



Vergleich der Werte von Hunden und Katzen

Bei der Erhebung der Werte für Tregs positiv für CD 25 und Fox P3 hatte sich gezeigt, dass die Werte bei Hunden signifikant höher lagen als bei Katzen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der Werte von Hunden und Katzen

Marker	Katze Median (Min.-Max.)	Hund Median (Min.-Max.)	p-Wert (Mann-Whitney-U)
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ unstimuliert	0.13 (0.03 - 0.35)	1.74 (0.29 - 3.57)	<0.0001
CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ stimuliert	5.54 (1.27 - 16.3)	5.51 (1.4 - 28.9)	0.5678
FoxP3 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ unstimuliert	0.23 (0.05 - 0.44)	3.85 (1.68 - 6.03)	<0.0001
FoxP3 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ stimuliert	9.32 (1.42 - 21.1)	11.1 (3.21 - 45.0)	<0.0001
CD25 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ unstimuliert	0.28 (0.26 - 0.44)	4.62 (1.86 - 13.2)	<0.0001
CD25 ⁺ und CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ stimuliert	5.90 (4.02 - 7.40)	50.7 (17.9 - 95.6)	<0.0001
CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ unstimuliert	0.02 (0.00 - 0.03)	1.10 (0.34 - 2.59)	<0.0001
CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ stimuliert	0.98 (0.08 - 1.65)	7.86 (1.13 - 44.0)	0.0002
CD4 ⁺ CD25 ⁺ unstimuliert	0.26 (0.15 - 0.84)	1.35 (0.65 - 5.16)	<0.0001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ stimuliert	5.18 (1.1 - 10.27)	31.1 (5.26 - 62.1)	0.0015
CD4 ⁺ unstimuliert	16.76 (6.21 - 39.0)	44.1 (33.0 - 59.1)	<0.0001
CD4 ⁺ stimuliert	32.72 (22.9 - 63.3)	41.5 (26.7 - 67.4)	0.5678

Diskussion

Mit dieser Arbeit konnten die flowzytometrischen Methoden zur Detektion von Tregs im peripheren Blut beim Hund und der Katze mittels dem Flowzytometer Guava Easy Cyte HT8 etabliert werden. Diese wurden angewendet um Tregs bei gesunden Hunden und Katzen zu quantifizieren. Gesunde Katzen wiesen signifikant tiefere Werte an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs auf als gesunde Hunde. Die bei gesunden Hunden und Katzen gemessenen Werte geben einen Anhaltspunkt für weiterführende Arbeiten, welche die immunologische Antwort bezüglich der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs auf pathologische Prozesse wie Allergien, Autoimmunerkrankungen oder chronische Infektionen bei Hunden und Katzen untersuchen.

Mögliche Limitationen der Studie umfassen die Einschlusskriterien und die relativ geringe Anzahl der Tiere. In dieser Arbeit wurden die Hunde und Katzen als „gesund“ definiert anhand von Anamnese und eines klinischen Untersuchs. Durch diesen Untersuch kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Tiere in der Studie ein immunologisches Problem hatten, welches nur subklinisch ausgeprägt war. Dieser Umstand könnte das Auftreten von Ausreißern, welche in einigen Parametern festgestellt wurde, erklären.

Untersuchungen an gesunden Hunden

Resultate gesunde Hunde

Es gibt verschiedene Arbeiten zur Untersuchung von $CD4^+FoxP3^+$ Zellen bei gesunden Hunden. Tabelle 10 zeigt einen Vergleich der Daten der vorliegenden Studie mit Werten aus der Literatur. Die bisher ermittelten Mediane für $CD4^+FoxP3^+$ Zellen liegen zwischen 3.4%(+/-0.2) und 4.3%(+/- 0.7) ⁴²⁴³. Sie sind somit höher als der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Wert von 1.74%(+/- 0.97).

Der Median der $CD4^+FoxP3^+$ Zellen ist deutlich tiefer als der von $FoxP3^+$ und $CD25^+FoxP3^+$ Zellen. Dieser Umstand gibt Anlass zur Annahme, dass es weitere $FoxP3^+$ Zellpopulationen gibt welche weder $CD4^+$ noch $CD25^+$ sind. Beim Menschen

wurden andere Zellen gefunden, welche zur Expression von FoxP3 befähigt sind. Zu diesen Zellen gehören CD4⁺CD25⁻ Zellen, CD4⁻CD8⁺ Zellen und CD21⁺ Zellen ^{49,50}.

Tabelle 10: Vergleich der in der vorliegenden Arbeit gemessenen CD4⁺FoxP3⁺ Prozentwerte mit Werte aus der Literatur

Referenz	Werte der gemessenen CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ Werte (Mittelwerte)	Verwendete Antikörper
Biller et al. ⁴³ Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer	4.3 (+/- 0.7)	Rat Anti-dog CD4-FITC (clone YKIX302.9; AdBserotec Raleigh , NC) Anti-mouse/rat FoxP3-PE(clone FJK-16s; eBioscience, San Diego)
Pinheiro et al. ⁴² Phenotypic and functional characterization of a CD4 ⁺ CD25 ^{high} FOXP3 ^{high} regulatory T-cell population in the dog	3.4 (+/- 0.2)	Rat Anti-dog CD4-FITC (clone YKIX302.9; AdBserotec Raleigh , NC) Anti-mouse/rat FoxP3-PE(clone FJK-16s; eBioscience, San Diego)
Vorliegende Arbeit	1.75 (+/- 0.97)	Rat Anti-dog CD4-FITC (clone YKIX302.9; AdBserotec Raleigh , NC) Anti FoxP3 eFluor® (clone 150 D/E4 eBioscience, San Diego Ref.: 50-4774).

Stimulation der Tregs bei gesunden Hunden

Für die vorliegende Arbeit wurden PBMCs von gesunden Hunden nach vorhanden Protokollen stimuliert ^{43,48}. Das von Biller et al. verwendete Protokoll wurde für die vorliegende Arbeit adaptiert, die Expression von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ wurde nach 3 Tagen gemessen ⁴³. Diese Adaption war notwendig, um einer starken Abnahme der Vitalität der Zellen entgegenzuwirken. Als Folge der Abnahme an Vitalität der Zellen würden bei der Verarbeitung diese zu stark beschädigt werden und es könnten keine korrekten Messungen mehr durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der untersuchten Marker auf den PBMCs durch die *in vitro* Stimulation mit Mitogen und Zytokinen signifikant erhöht.

Die gewonnenen Ergebnisse für die Stimulation von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen bezüglich des Ausmasses ihrer Erhöhung stimmen mit den Ergebnissen anderer Publikationen überein ⁴³⁴⁸.

Untersuchungen an gesunden Katzen

Resultate Katzen

Erste Untersuchungen bei der Katze über FoxP3⁺ Zellen wurden von Lankford et al. und Vahlenkamp et al. durchgeführt ^{44,45}. Lankford et al. konnten die FoxP3 Population in weitere Untergruppen unterteilen ^{44,45}.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen, daher wurden die untersuchten Zellen nicht weiter aufgeschlüsselt. Die hier ermittelten Werte liegen tiefer als in anderen Publikationen. In anderen Publikationen wurden Werte zwischen ca. 0.4 - 4% ermittelt ⁴⁴, wohingegen in der vorliegenden Arbeit keine Werte über 0.99% gemessen werden konnten. Bei den anderen Publikationen wurden allerdings andere Antikörper verwendet als in dieser Arbeit.

Die Mediane der CD4⁺FoxP3⁺ und der CD25⁺ und CD25⁺FoxP3⁺ Zell-Population lagen tiefer als jene der FoxP3⁺ und CD25⁺FoxP3⁺ Zell-Population. Dieser Umstand lässt vermuten, dass die Expression von FoxP3 nicht ausschliesslich auf die CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Zell-Population begrenzt ist. Bis heute konnte allerdings nicht geklärt werden, ob diese CD25⁺FoxP3⁺Zellen bei der Katze regulatorische Funktionen erfüllen ⁴⁹. Bei Untersuchungen an Mäusen konnten keine weiteren Zellpopulationen ermittelt werden, die FoxP3 exprimieren. Allerdings konnten sowohl bei der Katze als auch beim Menschen CD4⁺CD25⁻ Zellen, CD4-CD8⁺Zellen und CD21⁺ Zellen gefunden werden, die FoxP3 exprimieren ⁴⁴⁵⁰.

Der Wert der CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ Zellpopulation liegt bei Menschen, bei Mäusen und bei Hunden laut Literatur zwischen 5-10% ⁹⁵¹. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Zellen bei der gesunden Katze lagen tiefer als die Werte von Menschen, Mäusen und Hunden.

Dass die Resultate von Katzen tiefer als die von Hunde waren, könnte daran liegen, dass Katzen einen anderen Pathomechanismus auf die Antwort auf Allergenen aufweisen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Reaktionsmuster, die Katzen als Antwort auf Allergien zeigen, sich wesentlich von denen von Hunden unterscheiden. Katzen reagieren auf Allergien mit vier Hauptreaktionsmustern: miliare Dermatitis, Exkoration an Kopf und Nacken mit Juckreiz, selbstinduzierte Alopezie und eosinophiler Dermatitis ⁵². Diese Reaktionsmuster sind beim Hund nur selten zu finden.

Normalwerte CD4⁺ bei der Katze

Normalwerte für CD4⁺ Zellen wurden von Byrne et al. ermittelt ⁵³. Diese liegen mit 22.9% - 45% höher als die in dieser Arbeit ermittelten Werte ^{53,54}. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Median von 16.7% ermittelt werden. Allerdings wurden unterschiedliche Antikörper (Clone: CAT30A vs. vpg34) benutzt, somit wird es schwer die beiden Ergebnisse zu vergleichen ⁵³.

Stimulation der nTregs bei gesunden Katzen

Es gibt bisher nur eine Publikation über die erfolgreiche Stimulation von CD4⁺CD25⁺ Zellen bei Katzen. Die Zellen wurden dort mit der Zugabe von Con A, IL2, LPS stimuliert ⁴⁵.

Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit PBMCs von Katzen mit Con A, IL-2 und TGF-beta stimuliert. Es konnte dabei eine erfolgreiche Stimulation der Zellen gezeigt werden. Die Zugabe von TGF-beta wurde nach Biller et al. für die Verwendung bei PBMCs von Katzen modifiziert ⁴³. Dies ist das erste Mal, dass TGF-beta auch zur Stimulation von PBMCs bei Katzen benutzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die PBMCs der Katze nach allen Gesichtspunkten untersucht und stimuliert werden können (siehe Tabelle 8). Mit der Stimulation wurde veranschaulicht, dass die hier verwendeten Antikörper an die jeweiligen Rezeptoren binden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit der vorliegenden Arbeit eine signifikante Stimulation der CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen bei der Katze gezeigt werden

konnte. Es wurde aufgewiesen, dass die Werte, die von PBMCs von gesunden Katzen gewonnen wurden, auf der Bindung zwischen Antikörper und Antigen beruhen.

Vergleich der Tregs bei Hunden und Katzen

Katzen zeigten signifikant tiefere Werte an Tregs als Hunde. Das könnte daran liegen, dass Katzen einen anderen Pathomechanismus auf die Antwort auf Allergenen aufweisen. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Reaktionsmuster, die Katzen als Antwort auf Allergien zeigen, sich wesentlich von denen von Hunden unterscheiden. Katzen reagieren auf Allergien mit vier Hauptreaktionsmustern: miliare Dermatitis, Exkoration an Kopf und Nacken mit Juckreiz, selbstinduzierte Alopezie und eosinophiler Dermatitis ⁵². Diese Reaktionsmuster sind beim Hund nur selten zu finden. Hunde reagieren auf Allergien meist mit generalisiertem Juckreiz, belecken der Pfoten, Erythem oder erythematösen Papeln, Otitis externa ^{56,57}. Menschen reagieren auf Allergien mit Nesselsucht, Schnupfen, Konjunktivitis und Hautausschlägen ⁴.

Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde ein Repertoire verschiedener Tregs untersucht, um festzustellen, welche Populationen in Zukunft als massgeblicher Parameter für weitere Untersuchungen dienen können. Unsere Resultate demonstrieren, dass die CD4⁺FoxP3⁺- und die CD4⁺CD25⁺- Zellpopulation dafür vielversprechende Parameter darstellen, da diese innerhalb der untersuchten Katzen- und Hunde-Population die geringsten Streuungen aufwiesen. Schon Biller et al nutzten CD4⁺FoxP3⁺-Zellen als Basis ihrer Untersuchungen ^{42,43}.

Katzen haben signifikant tiefere Werte an Tregs als Hunde, was darin begründet sein kann, dass sie einen anderen Pathomechanismus auf die Antwort von Allergenen aufweisen als Hunde.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tregs erfolgreich stimuliert werden können mit der Zugabe von den Mitogenen ConA, IL2 und TGF-beta.

Referenzen

1. Nandakumar, S., Miller, C. W. & Kumaraguru, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. *Clin Mol Allergy* 7, 5 (2009).
2. Billingham, R. E., Brent, L. & Medawar, P. B. Actively acquired tolerance of foreign cells. *J Immunol.* 2010 Jan 1;184(1):5-8.
3. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 1969 Nov 7;166(3906):753-5.
4. Sakaguchi S. Regulatory T Cells: Methods and Protocols, *Methods Mol Biol.* 2011;707:3-17.
5. Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723–737 (1970).
6. Bloom, B. R., Salgame, P. & Diamond, B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today* 13, 131–136 (1992).
7. Green, D. R., Flood, P. M. & Gershon, R. K. Immunoregulatory T-cell pathways. *Annu Rev Immunol.* 1983;1:439-63.
8. Simpson, E. Special regulatory T-cell review: regulation of immune responses – examining the role of T cells. *Immunology* 123, 13–16 (2008).
9. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151–1164 (1995).
10. Powrie, F., Correa-Oliveira, R., Mauze, S. & Coffman, R. L. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J. Exp. Med.* 179, 589–600 (1994).

11. Leach, M. W., Bean, A. G., Mauze, S., Coffman, R. L. & Powrie, F. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RB^{high} subset of CD4⁺ T cells. *Am. J. Pathol.* 148, 1503–1515 (1996).
12. Qin, S. X., Cobbold, S., Benjamin, R. & Waldmann, H. Induction of classical transplantation tolerance in the adult. *J. Exp. Med.* 169, 779–794 (1989).
13. Waldmann, H. & Cobbold, S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4⁺ regulatory cells? *Immunity* 14, 399–406 (2001).
14. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 330–336 (2003).
15. Morgan, M. E. et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66, 13–20 (2005).
16. Brunkow, M. E. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27, 68–73 (2001).
17. Wildin, R. S. et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 27, 18–20 (2001).
18. Romagnani, S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36, 1357–1366 (2006).
19. Holm, T. L., Nielsen, J. & Claesson, M. H. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* 112, 629–641 (2004).
20. Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. & Roark, J. H. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 535–562 (1997).
21. Godfrey, D. I. & Kronenberg, M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 114, 1379–1388 (2004).

22. Wu, K., Bi, Y., Sun, K. & Wang, C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell. Mol. Immunol.* 4, 269–275 (2007).
23. Rouse, B. T. Regulatory T cells in health and disease. *J Intern Med* 262, 78–95 (2007).
24. Satoguina, J. S. et al. Tr1 and naturally occurring regulatory T cells induce IgG4 in B cells through GITR/GITR-L interaction, IL-10 and TGF-beta. *Eur. J. Immunol.* 38, 3101–3113 (2008).
25. Weiner, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 207–214 (2001).
26. Kojima A et al. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics*. 1981;14(1-2):15-27.
27. Penhale, W. J., Farmer, A., McKenna, R. P. & Irvine, W. J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin. Exp. Immunol.* 15, 225–236 (1973).
28. Penhale, W. J., Irvine, W. J., Inglis, J. R. & Farmer, A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. *Clin. Exp. Immunol.* 25, 6–16 (1976).
29. Sakaguchi, S., Takahashi, T. & Nishizuka, Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J. Exp. Med.* 156, 1577–1586 (1982).
30. Sakaguchi, S. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. *Journal of Experimental Medicine* 156, 1565–1576 (1982).

31. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. & Masuda, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine* (1985).
32. Sugihara, S. et al. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt-1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J. Immunol.* 141, 105–113 (1988).
33. Smith, H., Lou, Y. H., Lacy, P. & Tung, K. S. Tolerance mechanism in experimental ovarian and gastric autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* (1992).
34. Powrie, F. & Mason, D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J. Exp. Med.* (1990).
35. McKeever, U. et al. Adoptive transfer of autoimmune diabetes and thyroiditis to athymic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7618–7622 (1990).
36. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):387-96.
37. Powrie F et al. Phenotypically distinct subsets of CD4 +T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scidmice. *Int Immunol.* 1993 Nov;5(11):1461-71.
38. Chatila, T. A. et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106, R75–81 (2000).

39. Bennett, C. L. et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27, 20–21 (2000).
40. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science Signaling* (2003).
41. Khattry, R., Cox, T., Yasayko, S.-A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337–342 (2003).
42. Pinheiro, D. et al. Phenotypic and functional characterization of a CD4⁺CD25^{high} FOXP3^{high} regulatory T-cell population in the dog. *Immunology* 132, 111–122 (2010).
43. Biller, B. J., Elmslie, R. E., Burnett, R. C., Avery, A. C. & Dow, S. W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116, 69–78 (2007).
44. Lankford, S. et al. Cloning of feline FOXP3 and detection of expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 122, 159–166 (2008).
45. Vahlenkamp, T. W., Tompkins, M. B. & Tompkins, W. A. F. Feline Immunodeficiency Virus Infection Phenotypically and Functionally Activates Immunosuppressive CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *J Immunol.* 2004 Apr 15;172(8):4752-61.
46. Biller, B. J., Elmslie, R. E., Burnett, R. C., Avery, A. C. & Dow, S. W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 116, 69–78 (2007).
47. Faldyna, M., Levá, L., Knötigová, P. & Toman, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82, 23–37 (2001).

48. Abrams, V. K. et al. A novel monoclonal antibody specific for canine CD25 (P4A10): Selection and evaluation of canine Tregs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 135, 257–265 (2010).
49. Morgan ME et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*. 2005 Jan;66(1):13-20.
50. Ziegler, S. F. FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.* (2006).
51. Dieckmann et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4+ CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001 Jun 4;193(11):1303-10.
52. Favrot C et al. Establishment of diagnostic criteria for feline nonflea-induced hypersensitivity dermatitis. *Vet Dermatol*. 2012 Feb;23(1):45-50
53. Byrne KM et al. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000 Feb 25;73(2):167-82.
54. Campbell, D. J. et al. Age-related differences in parameters of feline immune status. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000 Feb 25;73(2):167-82.

Anhang



**Universität
Zürich** UZH

**Departement für Kleintiere
Klinik für Kleintiermedizin**

Universität Zürich
Klinik für Kleintiermedizin
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
Telefon +41 44 635 81 12
Telefax +41 44 635 89 20
www.kltmed.uzh.ch

Prof. Dr. Claude Favrot
Abteilungsleiter Dermatologie
Telefon +41 44 635 83 75
Telefax +41 44 635 89 30
cfavrot@vetclinics.uzh.ch

Einverständniserklärung

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr

Sie wurden am _____

- ☐ via Telefon
☐ in der Sprechstunde

informiert und haben uns freundlicherweise die Erlaubnis gegeben, bei Ihrem Hund eine

- ☐ Blutentnahme
☐ Biopsieentnahme

durchzuführen.

Höflich bitten wir Sie, dies mit Ihrer Unterschrift zu bestätigen.

Name: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____



**Universität
Zürich** UZH

**Departement für Kleintiere
Klinik für Kleintiermedizin**

Universität Zürich
Klinik für Kleintiermedizin
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
Telefon +41 44 635 81 12
Telefax +41 44 635 89 20
www.kltmed.uzh.ch

Prof. Dr. Claude Favrot
Abteilungsleiter Dermatologie
Telefon +41 44 635 83 75
Telefax +41 44 635 89 30
cfavrot@vetclinics.uzh.ch

Einverständniserklärung

Sehr geehrte Dame, sehr geehrter Herr

Sie wurden am _____

- ☐ via Telefon
☐ in der Sprechstunde

informiert und haben uns freundlicherweise die Erlaubnis gegeben, bei Ihrer Katze eine

- ☐ Blutentnahme
☐ Biopsieentnahme

durchzuführen.

Höflich bitten wir Sie, dies mit Ihrer Unterschrift zu bestätigen.

Name: _____

Datum: _____ Unterschrift: _____

Curriculum Vitae

Vorname Name	Patrick Hügli
Geburtsdatum	04.11.1978
Geburtsort	Zürich/Schweiz
Nationalität	Schweiz
Heimatort	Meikirch/Bern

Schulausbildung

04/1985 - 05/1989	Primarschule, Zumikon, Schweiz
07/1989 - 06/1990	German School, Tokyo, Japan
08/1990 - 10/1993	German-Swiss International School, Hong Kong
11/1993 - 07/1995	Schola Europaea Luxembourg, Luxembourg,
09/1995 - 05/1996	Lyceum Alpinum, Zuz, Schweiz
08/1996 - 09/1999	Mittelschule Dr. Buchmann, Zürich, Schweiz

Höchster Schulabschluss

14/09/1999	eidgenössischen Maturität, Basel, Schweiz
------------	---

Studium

09/2005 - 01/2013	Studium der Veterinärmedizin Universität Zürich, Schweiz
18/01/2013	Abschlussprüfung vet. med. Universität Zürich, Schweiz Doktorat und Anfertigung der Dissertation
01/02/2013 – 20/02/2016	unter Leitung von Prof. Dr. med. vet. Claude Favrot Klinik für Kleintiermedizin, Abteilung Dermatologie Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Alle fachrelevanten Anstellungen nach Abschluss des veterinärmedizinischen Studiums

01/2014 – 06/2015	Internship chirurgische Abteilung Klinik für Kleintierchirurgie Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
06/2015 – 29/2/2016	Assistenzarzt neurologische Abteilung Klinik für Kleintierchirurgie Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

31.03.2016